DIE KLONIERUNG VON GENOMISCHER UND COPY-DNA: UNTERSUCHUNGEN AN NUKLEÄREN GENEN FÜR PLASTIDÄRE POLYPEPTIDE AUS SPINACIA OLERACEA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
JOCHEN TITTGEN
aus
Düsseldorf
1985

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543905_0022

DIE KLONIERUNG VON GENOMISCHER UND COPY-DNA:

UNTERSUCHUNGEN AN NUKLEAREN GENEN FÜR PLASTIDÄRE POLYPEPTIDE

AUS SPINACIA OLERACEA

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
JOCHEN TITTGEN
aus
Düsseldorf
1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Herrmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Hollenberg
Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1985

MEINEN ELTERN

ABKÜRZUNGEN

Å	:	Ångström
ACA	:	ε-Aminocapronsäure
Ac	:	Acetat
Amp	:	Ampicillin
APTE	:	Diazophenylthioäther
AS	:	Aminosäure(n)
b	:	Base(n)
BAM	:	Benzamidin
bp	:	Basenpaare
BSA	:	Rinderserumalbumin
Ci	:	Curie
cpm	:	Zählimpulse pro Minute
DMSO	:	Dimethylsulfoxid
DNAase	:	Desoxyribonuklease
dNTP	:	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	:	Dithiothreitol
EDTA	:	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	:	Formamid
FTL	:	Gefrier-Tau-Extrakt
HAc	:	Essigsäure
Hepes	:	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
Ig	:	Immunglobulin
IPTG	:	Isopropyl-ß-D-thiogalaktopyranosid
kb	:	Kilobasen
kd	:	Kilodalton
MES	:	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
MGM	:	Molekulargewichtsmarker
n	:	nukleär
N	:	Nukleotid(e)
OD	:	optische Dichte
p	:	Plasmid
PAA	:	Polyacrylamid
PEG	:	Polyethylenglycoll
PMSF	:	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	:	Polyvinylpyrrolidon
RNAase	:	Ribonuklease

RPC	:	Reverse Phase Chromatography
RVT	:	Reverse Transkriptase
SDS	:	Sodiumdodecylsulfat
SE	:	Beschallungs-Extrakt
So	:	Spinacia oleracea
SSC	:	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
SSPE	:	Natriumchlorid/EDTA/Phosphat-Puffer
TCA	:	Trichloressigsäure
Tet	:	Tetracyclin
TLCK	:	N-a-p-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon
TPCK	:	L-1-Tosylamid-2-phenyl-ethylchlormethylketon
TpT	:	Terminaltransferase
Tris	:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	:	Enzymeinheit (unit)
UE	:	Untereinheit
Upm	:	Umdrehungen pro Minute
UV	:	ultraviolettes Licht
UZ	:	Ultrazentrifuge
X-Gal	:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid

DNA- und RNA-Spezies

DNA	:	Desoxyribonukleinsäure
ptDNA	:	plastidäre DNA
cDNA	:	komplementäre oder auch copy-DNA
sscDNA	:	einzelsträngige cDNA
dscDNA	:	doppelsträngige cDNA
RNA	:	Ribonukleinsäure
rRNA	:	ribosomale RNA
tRNA	:	Transfer-RNA
mRNA	:	Messenger-RNA
Poly(A)$^+$-RNA	:	polyadenylierte RNA
Poly(A)$^-$-RNA	:	nicht polyadenylierte RNA

Polypeptide und Proteinkomplexe (Abkürzungen)

CF_1	:	in das Organellenstroma ragender, katalytischer Teil der ATP-Synthase
CF_o	:	membraninterner Teil der ATP-Synthase
DEL	:	Delta-Untereinheit der ATP-Synthase (CF_1-Teil)
Rubisco	:	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase
SSU	:	kleine Untereinheit von Rubisco
LSU	:	große Untereinheit von Rubisco
PC	:	Plastocyanin
LHCP	:	Chlorophyll a/b-bindendes Polypeptid des Antennenkomplexes des Photosystem II
34kd-Polypeptid	:	34 kd großes Polypeptid des Wasserspaltungskomplexes (assoziiert mit dem Photosystem II)
Rieske	:	FeS-Protein des Cytochrom f/b_6-Komplex
Cyt f	:	Cytochrom f
Cyt b_6	:	Cytochrom b_6

Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabenkode mit Hydropathieindex

A = Ala	(Alanin)	+1,8	M = Met	(Methionin)	+1,9
C = Cys	(Cystein)	+2,5	N = Asn	(Asparagin)	-3,5
D = Asp	(Asparaginsäure)	-3,5	P = Pro	(Prolin)	-1,6
E = Glu	(Glutaminsäure)	-3,5	Q = Gln	(Glutamin)	-3,5
F = Phe	(Phenylalanin)	+2,8	R = Arg	(Arginin)	-3,5
G = Gly	(Glycin)	-0,4	S = Ser	(Serin)	-0,8
H = His	(Histidin)	-3,2	T = Thr	(Threonin)	-0,7
I = Ile	(Isoleucin)	+4,5	V = Val	(Valin)	+4,2
K = Lys	(Lysin)	-3,9	W = Trp	(Tryptophan)	-0,9
L = Leu	(Leucin)	+3,8	Y = Tyr	(Tyrosin)	-1,3

I. EINLEITUNG

II. MATERIAL UND METHODEN

A. Anzucht und Ernte der Versuchspflanzen

B. Isolierung und Fraktionierung von Poly(A)$^+$-RNA

B.1. Pufferlösungen
B.2. Nukleinsäureextraktion
B.3. Lithiumchloridfällung
B.4. Trennung von Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA über Oligo(dT)-Zellulose
B.5. Fraktionierung von Poly(A)$^+$-RNA im Saccharosegradienten
B.6. *In vitro* Translationen und Immunpräzipitationen

C. Synthese und Klonierung doppelsträngiger DNA (dscDNA) nach der "Homopolymer-Methode"

C.1. Reagenzien und Pufferlösungen
C.2. Synthese einzelsträngiger, komplementärer DNA (sscDNA)
C.3. 3'-terminale Elongation der sscDNA mit ^{3}H-dCTP
C.4. Synthese doppelsträngiger, komplementärer DNA (dscDNA)
C.5. 3'-terminale Elongation der dscDNA mit ^{3}H-dCTP
C.6. Vorbereitung des Vektors pBR322 für die Klonierung der dscDNA
C.7. Klonierung der dscDNA im Vektor pBR322
C.7.1. Verknüpfung von dscDNA und Vektor-DNA
C.7.2. Anzucht der Bakterienzellen
C.7.3. Transformation und Plattierung

D. Synthese und Klonierung doppelsträngiger DNA (dscDNA) nach der "Linker-Methode"

D.1. Reagenzien und Pufferlösungen
D.2. Synthese einzelsträngiger, komplementärer DNA (sscDNA)
D.3. Synthese doppelsträngiger, komplementärer DNA (dscDNA)
D.4. Methylierung der dscDNA
D.5. S_1-Nukleasebehandlung der methylierten dscDNA
D.6. Nachbehandlung der dscDNA mit dem Klenow-Fragment
D.7. Addition von phosphorylierten EcoRI-Linkern an die dscDNA

UNIV. LEIDEN BIBL.

D.8. EcoRI-Restriktion der dscDNA
D.9. Größenfraktionierung der dscDNA über Sepharose-4B
D.10. Ligation der dscDNA mit dem Lambda-Vektor gt11
D.11. Verpackung, Plattierung und Selektion rekombinanter Phagen
D.12. Alkalische Agarosegelelektrophorese

E. RNA-Selektion und Immunpräzipitation
E.1. Reagenzien und Pufferlösungen
E.2. Kupplung von Plasmid-DNA an Sephacryl S-500
E.3. RNA-Selektion mit an Sephacryl S-500 gebundener DNA
E.3.1. Vorbehandlung der Matrix vor der ersten Hybridisierung
E.3.2. Hybridisierungsprozedur mit Poly(A)$^+$-RNA (Hybridselektion)
E.3.3. *In vitro* Translation der selektierten Poly(A)$^+$-RNA
E.3.4. Fraktionierung der *in vitro* Translationsprodukte
E.3.5. Fluorographie
E.4. Immunpräzipitation mit Staphylococcus aureus, Stamm Cowan I

F. Charakterisierung ausgewählter cDNA-Klone durch Sequenzierung
F.1. Bestimmung der Größen klonierter cDNA-Fragmente
F.2. Umklonierung der cDNA-Fragmente in den Vektor pUR222
F.3. Sequenzierung der cDNA-Fragmente

G. Hybridisierung identifizierter cDNA-Sequenzen gegen vorselektierte cDNA-Klone
G.1. Trimmen der sequenzierten cDNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen
G.2. Transfer von Bakterienkolonien auf Nitrozellulose und die Hybridisierung mit ^{32}P-markierten cDNA-Fragmenten

H. Hybridisierung identifizierter cDNA-Fragmente gegen Poly(A)$^+$-RNA ("Northern Transfer")
H.1. Agarosegelelektrophorese von Glyoxal- und Dimethylsulfoxid-denaturierter Poly(A)$^+$-RNA
H.2. Transfer von Poly(A)$^+$-RNA auf Nitrozellulose

I. Import zellfrei synthetisierter Polypeptide in isolierte, intakte Spinatchloroplasten

I.1. Isolierung intakter Chloroplasten
I.2. Zellfreie Synthese von Polypeptiden im Weizenkeimextrakt
I.3. Import zellfrei synthetisierter Polypeptide
I.4. Präparation löslicher und membranassoziierter Chloroplastenproteine
I.5. SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

J. Isolation von Zellkernen und Präparation nukleärer DNA

J.1. Reagenzien und Pufferlösungen
J.2. Zellkernisolierung
J.3. DNA-Extraktion aus isolierten Zellkernen
J.4. Reinigung der nukleären DNA über einen CsCl-Gradienten
J.5. Qualitätskontrolle der gereinigten nukleären DNA
J.6. Partialrestriktion nukleärer DNA mit dem Restriktionsenzym Sau3A
J.7. Fraktionierung partialrestringierter DNA im Saccharosegradienten

K. Klonierung in Lambda-Bakteriophagen

K.1. Reagenzien und Pufferlösungen
K.2. Anzucht der Lambda-Bakteriophagen
K.2.1. Anzucht der Wirtsbakterien
K.2.2. Lambda-Stammkulturen
K.3. Präparation von Lambda-DNA
K.3.1. Animpfung von Flüssigkulturen
K.3.2. Konzentrierung und Reinigung der Phagen
K.3.3. Extraktion von Lambda-DNA
K.3.4. Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der Lambda-DNA
K.4. Klonierung nukleärer DNA im EMBL4-Vektor
K.4.1. Präparation der EMBL4-DNA zur Klonierung
K.4.2. Restriktion der EMBL4-DNA
K.4.3. Selektive Fällung der Vektor-Fragmente mit Isopropanol
K.4.4. Ligation der nukleären und Vektor-DNA
K.4.5. Verpackung ligierter DNA im FTL/SE-Extrakt
K.4.6. Plattierung der Phagen
K.5. Präparation der Extrakte zur Verpackung von Lambda-DNA

L. Hybridisierung von ^{32}P-markierten DNA-Fragmenten gegen rekombinante Lambda-DNA

L.1. Pufferlösungen

L.2. Transfer von Plaques auf Nitrozellulose

L.3. Homologe Hybridisierung

M. Methoden zur Kartierung von DNA

M.1. Kartierung durch partielle Restriktion

M.2. Kartierung randständiger Schnittstellen

M.3. Kartierung durch Hybridisierung ("Southern Transfer")

N. Allgemeine Methoden

N.1. Reagenzien und Pufferlösungen

N.2. Bakterienanzucht

N.3. Plasmidisolation

N.4. DNA-Restriktion

N.5. Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

N.6. Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarose

N.7. Reinigung elektroeluierter DNA-Fragmente

N.7.1. Elutip-d Säulen

N.7.2. Sephadex-G100 Säulen

N.8. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

N.8.1. 3'-terminale Markierung von DNA-Fragmenten mit ($\alpha^{32}P$)-dNTP durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

N.8.2. Markierung von DNA-Fragmenten durch die DNA-Polymerase I

N.8.3. Klonierung in Plasmiden

III. ERGEBNISSE

A. Die cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Homopolymer-Methode"

A.1. Die Poly(A)$^+$-RNA als Matrize der cDNA-Synthesen

A.2. Die cDNA-Synthese ("Homopolymer-Methode") und die Qualität der cDNA-Klonbanken

A.3. Strategie zur Auffindung und Isolation bestimmter cDNA-Sequenzen

B. Die cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Linker-Methode"

C. Identifizierung und Charakterisierung der cDNA-Fragmente von PC, LHCP, DEL, SSU und des 34kd-Polypeptides

C.1. Identifizierung der cDNA-Fragmente

C.2. Größenbestimmung der cDNA-Fragmente

C.3. Größenbestimmung der mRNA-Spezies plastidärer, kernkodierter Polypeptide

C.4. Die verschiedenen cDNA-Klone für SSU

D. Die Sequenzen der identifizierten cDNA-Fragmente

D.1. Die cDNA-Sequenz eines Klones für Plastocyanin

D.2. Die cDNA-Sequenz eines Klones für die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase

D.3. Die cDNA-Sequenz eines Klones für ein Chlorophyll a/b-bindendes Polypeptid des Photosystems II

D.4. Die cDNA-Sequenz eines Klones für das 34kd-Polypeptid des Wasserspaltungskomplexes des Photosystems II

D.5. Die cDNA-Sequenz eines Klones für die SSU der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase

E. Import zellfrei synthetisierter, kernkodierter Polypeptide in isolierte, intakte Spinatchloroplasten

F. Genomische Klonierung

F.1. Präparation nukleärer DNA aus Zellkernen

F.2. Partialrestriktion und Fraktionierung nukleärer DNA

F.3. Qualität der genomischen Klonbank

F.3.1. Testligationen mit nukleärer und Vektor-DNA

F.3.2. Test des Verpackungssystems

F.3.3. Test der Ligationsbedingungen

F.3.4. Die verwendeten Wirtsbakterienstämme

G. Selektion und Identifizierung nukleärer Gene für SSU, PC und LHCP aus Spinat

G.1. Selektion des SSU-Genes durch Hybridisierung

G.2. Selektion weiterer nukleärer Gene durch Hybridisierung

G.3. Identifizierung des SSU-Genes durch Hybridselektion und RNA-Translation

H. Physikalische Kartierung des SSU-Genes von Spinat

H.1. Restriktionskartierung der λSonSSU-DNA

H.2. Partialrestriktion der klonierten, nukleären DNA mit EcoRI

H.3. Lokalisation des SSU-Genes auf der λSonSSU-DNA

J. Hybridisierung der nukleären λSonSSU-Subfragmente A-D gegen $Poly(A)^+$- und $Poly(A)^-$-RNA

K. Die molekulare Organisation des SSU-Genes von Spinat

K.1. Die Aminosäuresequenz des SSU-Polypeptides

K.2. Die 3'-Region des SSU-Genes von Spinat

K.3. Die 5'-Region des SSU-Genes von Spinat

K.3.1. Das Initiationskodon und seine Umgebung

K.3.2. Die Promotorregion des SSU-Genes von Spinat

K.3.2.1. Die TATA-Region des SSU-Genes

K.3.2.2. Sequenzen zwischen den Nukleotiden -70 und -90

K.3.2.3. Potentielle "Enhancer"-Elemente des SSU-Genes

L. Hybridisierung von cDNA- und nukleären DNA-Fragmenten gegen HindIII-restringierte Kern-DNA von Spinat

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

VII. DANKSAGUNG

VIII. LEBENSLAUF

I. Einleitung

Nach der Wiederentdeckung der Arbeiten von G. Mendel und der nach ihm benannten Regeln, die zum Fundament der modernen Genetik wurden, gab es zuerst durch Baur (1909) und Correns (1909) Hinweise auch auf nicht mendelnde Erbgänge. Diese Abweichungen waren durch die Vererbung charakteristischer Blattfärbungen entdeckt worden. Sie wurden später als "extrachromosomale" oder "cytoplasmatische" Erbgänge klassifiziert. In den darauf folgenden Jahrzehnten machten zahlreiche Untersuchungen an höheren Pflanzen deutlich, daß sie mit den Plastiden assoziiert sein mußten (Renner, 1934; Rhoades, 1946; Michaelis, 1955; Schötz, 1958; Stubbe, 1959; Hagemann, 1964; Röbbelen, 1966; von Wettstein, 1967 und Tilney-Bassett, 1970).

Der Nachweis der plastidären DNA, cytologisch durch Ris und Plaut (1962), biochemisch durch Chun et al. (1963), sowie Sager und Ishida (1963), die sich in ihren Eigenschaften von denen der nukleären DNA unterscheidet (Kirk, 1963) und der Befund, daß Chloroplasten eine eigene Translationsmaschinerie besitzen (Lyttleton, 1962; Eisenstadt und Brawerman, 1963; Spencer und Wildman, 1964) bestätigte die Vermutung, daß Plastiden über eine gewisse genetische Autonomie verfügen. Mittlerweile ist gesichert, daß sich die genetische Maschinerie autotropher Pflanzenzellen aus drei, räumlich getrennten Kompartimenten zusammensetzt (Kern/Cytoplasma, Mitochondrien, Plastiden). Jedes dieser Kompartimente verfügt über Einrichtungen, die für die Replikation (Kolodner und Tewari, 1975; Kirk und Tilney-Bassett, 1978) und Transkription ihrer DNA sowie die Synthese von Polypeptiden notwendig sind (Bohnert, 1976; Kirk und Tilney-Bassett, 1978; Herrmann und Possingham, 1980; Wollgiehn und Parthier, 1980).

Die genetischen Kompartimente sind jedoch nicht völlig autonom, sondern in vielfältiger Weise miteinander verknüpft. Sie steuern gemeinsam die Entwicklung eines Organismus. Die wechselseitige Beeinflussung von Kern/Cytoplasma und Plastiden wird besonders an der amerikanischen Gattung Oenothera deutlich, bei der man reversible Entwicklungsstörungen in der Nachkommenschaft nach dem Austausch von Plastiden und Zellkernen zwischen den Arten fand (Renner, 1934 und Stubbe, 1959). Man deutete die Inkompatibilität als Kommunikationsstorungen zwischen den beiden Kompartimenten. Die Inkompatibilitätserscheinungen be-

trafen beispielsweise die Fähigkeit zur Pigmentbildung (Ergrünung) der Plastiden eines Elters, wohingegen die Plastiden des anderen sich normal entwickelten. Plastiden, die in Gegenwart eines inkompatiblen Genoms die Fähigkeit zur Pigmentbildung verloren hatten, waren keine Spontanmutanten, da sie zurückgebracht unter ihrem artgleichen Genotyp sich durchaus wieder normal entwickelten. Solche Genom/Plastom-Artbastarde von Oenothera zeigen Schädigungen besonders im Bereich der lichtabhängigen Reaktionen, so bei den Pigmenten des Thylakoidsystems, der Samenkeimung, der CO_2-Fixierung und dem Blühverhalten (zusammenfassende Darstellungen : siehe Herrmann und Possingham, 1980; Kutzelnigg und Stubbe, 1974).

Unter den verschiedenen Plastidentypen ist der Chloroplast am eingehendsten untersucht. In ihm findet die Photosynthese statt, die die für alle Organismen lebensnotwendigen Produkte Kohlenhydrat und Sauerstoff liefert. Die Photosynthese besteht formal aus 2 Teilreaktionen, den Licht- und den Dunkelreaktionen, die miteinander verknüpft, aber dennoch räumlich voneinander getrennt sind. Die Lichtreaktionen finden in der Thylakoidmembran statt, wohingegen die Dunkelreaktionen in der Matrix des Chloroplasten lokalisiert sind. Insgesamt sind an der Photosynthese und an der Synthese der Pigmente (Chlorophylle und Carotinoide) mehr als 80 Enzyme beteiligt, die wohl meist als multimere Proteinkomplexe existieren . Berücksichtigt man darüberhinaus, daß an den Maschinerien der DNA-, RNA- und Proteinsynthese im Chloroplasten mehr als 100 Enzyme beteiligt sind, und daß die Synthesen von Lipiden und Nukleotiden ebenfalls komplexe enzymatische Reaktionsketten voraussetzten, so ist leicht einzusehen, daß die Kodierungskapazität der plastidären DNA (ihre Länge beträgt bei höheren Pflanzen ca. 150 kb; zusammenfassende Darstellungen : Kirk und Tilney-Bassett, 1978; Bedbrook und Kolodner, 1979; Tewari, 1979; Herrmann und Possingham, 1980) nicht ausreichen kann, alle plastidären Polypeptide zu verschlüsseln. Die ersten Hinweise, daß das Genom die unzureichende Kodierungskapazität des Plastoms kompensiert, kamen von Kawashima und Wildman (1972). Diese Autoren konnten an der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase, einem multimeren Schlüsselenzym der photosynthetischen Dunkelreaktion zeigen, daß dessen kleinere der beiden Untereinheiten durch die nukleäre DNA, die größere durch das Plastom kodiert wird. Mittlerweile ist der dualgenetische Ursprung weiterer plastidärer Proteinkomplexe nachge-

wiesen worden, vor allem der Translationsmaschinerie (Eneas-Filho et al., 1981) und -im Kontext meiner Arbeit von Interesse- der Thylakoidmembran (Herrmann et al., 1983 und 1985).

An der Lichtreaktion der Photosynthese, die, wie erwähnt, in der Thylakoidmembran abläuft, sind bei höheren Pflanzen ca. 45 verschiedenartige Polypeptide beteiligt. Sie besitzen Molekulargewichte von ca. 5-70 kd und die Mehrzahl von ihnen ist in 4 supramolekularen Multiproteinkomplexen organisiert, die räumlich benachbart und funktionell miteinander verknüpft sind. Die verschiedenen Komplexe lassen sich durch selektive Detergenzien aus der Thylakoidmembran isolieren und in ihre Untereinheiten zerlegen. Zu diesen Multiproteinkomplexen der Thylakoidmembran gehören das Photosystem I (Bengis und Nelson, 1975 und 1977; Nechushtai et al., 1981), die ATP-Synthase (Pick und Racker, 1979), der Cytochrom f/b_6-Komplex (Hurt und Hauska, 1981) und das Photosystem II (Mullet und Arntzen, 1981; Henry und Moeller, 1981; Westhoff et al., 1983) mit dem Wasserspaltungskomplex (Yamamoto et al., 1981; Åkerlund et al., 1982; Kuwabara und Murata, 1982; Westhoff et al., 1985). Beiden photosynthetischen Reaktionszentren können Antennenkomplexe zugeordnet werden (Bedbrook et al., 1980; Mullet et al., 1982). In Abb. 1 sind die elektrophoretisch getrennten Polypeptiduntereinheiten der Thylakoidmembrankomplexe von Spinacia oleracea gezeigt.

Vor allem die Arbeiten unseres Labors haben gezeigt, daß alle Komplexe der Thylakoidmembran Untereinheiten enthalten, die genetisch entweder plastidären oder nukleären Ursprungs sind (Herrmann et al., 1983 und 1985). In Tabelle I sind die Polypeptide der Membrankomplexe und ihr Kodierungsort aufgelistet. Die Tabelle enthält auch die Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase, die das Initiationsenzym der photosynthetischen Dunkelreaktion ist und die peripheren Membranproteine Ferredoxin (Huisman et al., 1978), NADP-Ferredoxinoxidoreduktase (Grossman et al., 1982), Chlorophyllidoxydoreduktase (Apel, 1981) und Plastocyanin (Grossman et al., 1982).

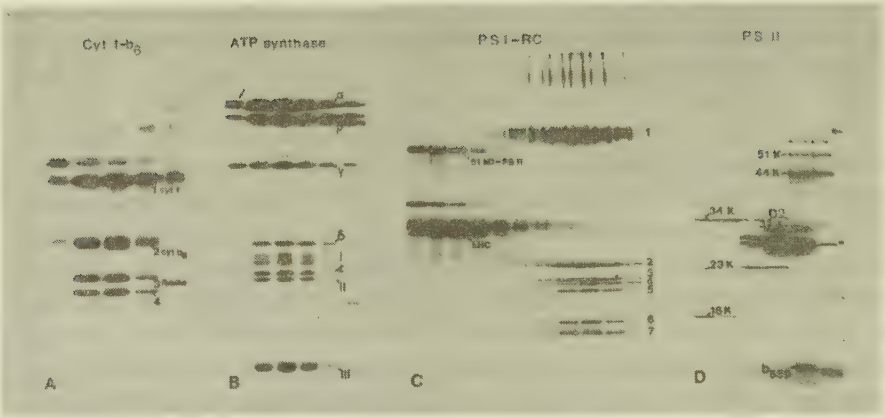


Abb. 1 : Polypeptidzusammensetzung von Proteinkomplexen der Thylakoidmembran aus Spinacia oleracea

Die Komplexe wurden durch differentielle Solubilisierung der Membran mittels verschiedener Detergenzien und anschließender Zentrifugation im Saccharosegradienten gereinigt. Gezeigt sind hier die Proteinmuster entsprechender Fraktionen der Saccharosegradienten nach Auftrennung auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (Herrmann et al. 1983)

A. Cytochrom f/b_6-Komplex
Untereinheiten: Cytochrom f (32 kd), Cytochrom b_6 (22 kd), Rieske FeS-Protein (18 kd), Polypeptid 4 (16 kd)

B. ATP-Synthase
Untereinheiten: CF_1-Teil α - ε (59, 52, 37, 19.5 und 16 kd)
CF_0-Teil mit I - III (18, 16 und 8 kd)

C. Photosystem I-Reaktionszentrum
Untereinheiten: 1-7 (68/66, 22, 18.5, 18, 16, 12 und 9 kd)

D. Photosystem II-Reaktionszentrum
Untereinheiten: P_{680}-Chlorophyll a-Apoprotein (51 kd), "44kd"-Chlorophyll a-Apoprotein, "32kd"-Herbizidbindeprotein/"32kd"-"D2"-Protein, Cytochrom b_{559} (10 kd), Polypeptide des Wasserspaltungsapparates (34, 23 und 16 kd)

Tabelle I : Verteilung der Gene für Thylakoidmembranpolypeptide und die Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase (Stromaprotein) höherer Pflanzen auf die genetischen Kompartimente Plastom und Genom

Membrankomplex	Untereinheiten	Kodierungsort	
		Plastom	Genom
Cytochrom f/b_6-Komplex	Cyt f	+	
	Cyt b_6	+	
	Rieske		+
	UE 4	+	
ATP-Synthase	CF_1-α	+	
	CF_1-β	+	
	CF_1-γ		+
	CF_1-δ		+
	CF_1-ε	+	
	CF_o-I	+	
	CF_o-II		+
	CF_o-III	+	
Photosystem I-Reaktionszentrum	UE 1 (68 kd)	+	
	UE 2 (22 kd)		+
	UE 3 (19 kd)		+
	UE 4 (18 kd)	unbekannt	
	UE 5 (16 kd)	unbekannt	
	UE 6 (12 kd)	unbekannt	
	UE 7 (10 kd)	unbekannt	
Photosystem I-Antennenproteine	insgesamt 2		+
Photosystem II-Reaktionszentrum	51 kd (P680)	+	
	44 kd	+	
	32 kd (1)	+	
	32 kd (2)	+	
	10 kd (b559)	+	
Photosystem II-Antennenproteine	insgesamt 2-5		+
Wasserspaltungskomplex	34 kd		+
	23 kd		+
	16 kd		+
Rubisco	LSU	+	
	SSU		+
Plastocyanin	11 kd		+
Ferredoxin	-		+
NADPH-Ferredoxinoxidoreduktase	37 kd		+
Chlorophyllidoxydoreduktase	36 kd		+

Zur Bestimmung der Kodierungsorte der Untereinheiten plastidärer Multiproteinkomplexe hat man sich zunächst die Tatsache zunutze gemacht, daß cytoplasmatische mRNA-Spezies in tierischen und pflanzlichen Systemen, im Unterschied zu den mRNA-Spezies von Organellen, an ihrem 3'-Terminus A-Polymere tragen (Wheeler und Hartley, 1975). Dieses Charakteristikum ermöglicht die chromatographische Fraktionierung zellulärer Gesamt-RNA in Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA an Oligo(dT)-Zellulose (Aviv und Leder, 1972). Die plastidären mRNA-Spezies gehören demnach zur Klasse der Poly(A)$^-$-RNA (Wheeler und Hartley, 1975). Folglich lassen sich Hinweise über die Kodierungsorte plastidärer Proteine anhand der Zugehörigkeit der entsprechenden mRNA-Spezies zur Poly(A)$^+$- oder Poly(A)$^-$-RNA erhalten. Hierzu wurden RNA-Fraktionen, Poly(A)$^+$-RNA aus Gesamtzell-RNA, Poly(A)$^-$-RNA aus gereinigten, intakten Chloroplasten, in zellfreien Extrakten (z.B. Kaninchen-Retikulocytenlysat) translatiert und die in vitro gebildeten Thylakoidmembranproteine serologisch, elektrophoretisch sowie durch den Vergleich ihrer proteolytischen Verdauungsmuster (Cleveland et al., 1977) mit denen der jeweiligen authentischen Membrankomponenten identifiziert (Westhoff et al., 1981).

Auf diese Weise wurden die Kodierungsorte von mehr als 30 der ca. 45 Polypeptide der Thylakoidmembran ermittelt. Dabei ergab sich, daß die Polypeptide genetisch etwa zur Hälfte dem Plastom bzw. dem Genom entstammen. Mittlerweile wurden die Gene von 15 Polypeptiden plastidären Ursprungs auf der Plastiden-DNA kartiert und zum Teil durch unser Labor sequenziert (Herrmann et al., 1985).

Das Zusammenspiel der beiden genetischen Kompartimente Plastide und Kern/Cytoplasma, wie generell bei intrazellulären genetischen Kompartimenten, gehört zu den zentralen und interessantesten Aspekten der modernen Biologie. Die Tatsache, daß Untereinheiten von multimeren Proteinen verschiedenen Kompartimenten entstammen, setzt eine äußerst vielschichtige, präzise Koordination zahlreicher Prozesse voraus. Hierzu gehören die Transkription plastidärer und nukleärer DNA, die Translation der mRNA im Cytoplasma und in der Plastide, der Import der cytoplasmatischen Polypeptide in das Organell und die Topogenese der funktionsfähigen Membrankomplexe. Dabei muß die Expression entsprechender Gene in den verschiedenen Kompartimenten nicht nur zeitlich, sondern auch stöchiometrisch reguliert werden. Die Erforschung solcher kom-

lexen Abläufe hat erst begonnen; besonders im Bereich der Regulation ist nichts bekannt. Kartierung, Klonierung und Sequenzierung der plastomkodierten Gene stellen Marksteine zur Analyse dieser Fragen dar. Dabei stellt die Thylakoidmembran auf Grund ihrer strukturellen Komplexität und ihrer physiologischen Adaptierbarkeit an verschiedene Umweltbedingungen ein interessantes Modell dar. Schließlich sei in diesem Zusammenhang auch nochmals an Fragen der biologischen Spezifität erinnert, die sich in den eingangs erwähnten Entwicklungsstörungen von Genom/Plastom-Artbastarden bei Oenothera manifestiert.

Es ist offensichtlich, daß das Studium der skizzierten Probleme Kenntnisse der Gene aus beiden Kompartimenten bedarf. Unsere Kenntnisse über nukleäre Gene sind allerdings noch sehr beschränkt. Der Grund liegt wohl in der Komplexität des Kern/Cytoplasma-Kompartimentes. Verglichen mit der Isolation plastidärer Gene sind daher die Selektion und Isolation nukleärer Gene, die für plastidäre Polypeptide kodieren, erheblich schwieriger und recht langwierig. Obwohl seit Jahren zahlreiche Forschungsgruppen an diesem Problem forciert arbeiten, sind seit der Isolation der ersten cDNA- und genomischen Klone für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase (SSU; Bedbrook et al., 1980; weitere Referenzen: siehe Ergebnisse und Diskussion) über das Chlorophyll a/b-bindende Polypeptid des Antennenkomplexes vom Photosystem II (LHCP; Coruzzi et al., 1983; Cashmore, 1984) keine Sequenzen publiziert worden, die für cytoplasmatische Untereinheiten der Thylakoidmembran kodieren.

Die vorliegende Arbeit hatte daher folgende Aufgaben zum Ziel :

1. Erstellung einer cDNA-Klonbank von Spinacia oleracea auf der Basis der Trennung von Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA.
2. Sichtung der cDNA-Klonbank auf Kandidaten, die für plastidäre Polypeptide kodieren (vornehmlich für Untereinheiten der Thylakoidmembran).
3. Charakterisierung der isolierten cDNA-Sequenzen mit verschiedenen Methoden und Bestimmung der Größen korrespondierender mRNA-Spezies.
4. Erstellung einer genomischen Klonbank von Spinacia oleracea und Selektion des einen oder anderen nukleären Genes.
5. Untersuchungen zur molekularen Organisation eines nukleären Genes

II. MATERIAL UND METHODEN

II.A. Anzucht und Ernte der Versuchspflanzen

Als Versuchspflanzen dienten Spinatkeimlinge (Spinacia oleracea), die zunächst für 7-8 Tage im Dunkeln bei 22°C und 95-98% relativer Feuchte auf Einheitserde Typ P als Substrat kultiviert wurden. Die etiolierten Keimlinge wurden dann über 16 Std mit Weislicht (Osram; mehr als 10000 Lux) beleuchtet. Die hiernach ergrünten Keimblätter wurden geerntet und bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

II.B. Isolierung und Fraktionierung von Poly(A)$^+$-RNA

II.B.1. Pufferlösungen

Extraktionspuffer	:	50 mM Tris/HCl	(pH 7,4)
		150 mM NaCl	
		2 % Natriumdodecylsulfat	
		2 % Natriumdodecylsarkosinat	
Phenol	:	gesättigt mit Extraktionspuffer	
THE-Puffer	:	80 mM Tris/HCl	(pH 8,3)
		1 mM EDTA	
Hochsalzpuffer	:	50 mM Tris/HCl	(pH 7,6)
		300 mM NaCl	
Niedrigsalzpuffer	:	10 mM Tris/HCl	(pH 7,6)
Gradientenpuffer	:	10 mM Tris/HCl	(pH 7,5)
		100 mM KCl	

II.B.2. Nukleinsäureextraktion

Die gefrorenen Keimblätter wurden im Verhältnis 1:1:1:1 (w/v) mit Extraktionspuffer, Chloroform und puffergesättigtem Phenol gemischt und im Waringblender für 5 sek homogenisiert. Das Homogenat wurde in autoklavierte Erlenmeyerkolben überführt und für 1 Std bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension durch 3 Lagen Gaze (20 µm Maschenweite) filtriert und das Filtrat zentrifugiert (15000 x g, 10 min, 4°C). Die wässrige Phase wurde nochmals unter gleichen Bedingungen mit Phenol/Chloroform (1:1, v/v) und anschließend noch zweimal mit Chloroform extrahiert. Die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase wurden durch Zugabe von 0,1 Vol. einer 3 M NaAc-Lösung (pH 6,0) und 1 Vol. Isopropanol bei 4°C über Nacht gefällt.

II.B.3. Lithiumchloridfällung

Die gefällten und sedimentierten Nukleinsäuren wurden in THE-Puffer aufgenommen (Nukleinsäurekonz.: 1,5 mg/ml). Die Lösung wurde dann mit 1,0 Vol. einer 4 M LiCl-Lösung versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die einzelsträngigen Nukleinsäuren fielen hierbei aus und konnten durch eine Zentrifugation konzentriert werden (Palmiter et al., 1973; Rhoads et al.,1975).

II.B.4. Trennung von Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA über Oligo(dT)-Zellulose

Zur Isolation von Poly(A)$^+$-RNA aus Gesamt-RNA wurde Oligo(dT)-Zellulose mit einer Bindungskapazität von 200 µg Poly(A)$^+$-RNA pro Gramm Matrix verwendet. Hierzu wurde die Gesamt-RNA mit einer Konzentration von 0,5 mg pro ml Hochsalzpuffer gelöst und an Oligo(dT)-Zellulose chromatographiert (Covey und Gierson, 1976; Edmonds et al., 1971; Aviv und Leder, 1972). Die Poly(A)$^-$-RNA passierte die Säule ungehindert, während die Poly(A)$^+$-RNA an die Zellulosematrix band. Die Säule wurde dann ausgiebig mit Hochsalzpuffer gewaschen (mehrfaches Säulenvolumen). Die Poly(A)$^+$-RNA konnte anschließend mit Niedrigsalzpuffer eluiert und mit Isopropanol aus dem Eluat gefällt werden.

II.B.5. Fraktionierung von Poly(A)$^+$-RNA im Saccharosegradienten

Die Fraktionierung der Poly(A)$^+$-RNA erfolgte in einem Saccharosegradienten (Noll et al., 1967; Driesel, 1975) mit den Eckkonzentrationen 0,4 M und 1,3 M Saccharose in Gradientenpuffer. Der Gradient wurde mit einem automatischen Gradientenformer (DESAGA) in Zentrifugenröhrchen mit einem Volumen von 12 ml und einer maximalen Trennstrecke von 8 cm erstellt. Die über Oligo(dT)-Zellulose isolierte Poly(A)$^+$-RNA wurde in Gradientenpuffer gelöst (RNA-Konzentration : 1 mg/ml) und hiervon wurden 0,2 ml auf den Gradienten aufgetragen. Die Sedimentation der Poly(A)$^+$-RNA erfolgte bei 40000 Upm und 4^{o}C über 18 Std (Beckman-UZ; Rotor SW 40Ti). Der Saccharosegradient wurde im Gradientenfraktionator (ISCO, Modell 640) mit der Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min in 0,4 ml Fraktionen zerlegt. Die Extinktion wurde kontinuierlich durch einen UV-Monitor bei 254 nm registriert. Den einzelnen Fraktionen wurden 0,1 Vol. einer 3 M NaAc-Lösung (pH 6,0) und 3 Vol. Ethanol hinzugefügt. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20^{o}C über Nacht. Zur Weiterverwendung mußte die sedimentierte RNA drei- bis viermal mit 70% Ethanol gewaschen werden, um die ebenfalls sedimentierte Saccharose zu entfernen. Die RNA wurde dann getrocknet und in autoklaviertem bidestilliertem Wasser mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgenommen.

II.B.6. In vitro Translationen und Immunpräzipitationen

Aliquote fraktionierter und unfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA wurden mit sterilem Wasser auf 0,1 µg/µl verdünnt. Davon wurden jeweils 4 µl für die *in vitro* Translation (2-facher Ansatz) im Kaninchen-Retikulocytenlysat eingesetzt (vgl. II.E.3.3.). Etwa 5% der Translationsansätze wurden als Translationskontrollen abgenommen. Die übrigen 95% wurden für Immunpräzipitationen mit verschiedenen Antiseren verwendet (Westhoff und Zetsche, 1981). Die eingesetzten Antiseren reagierten monospezifisch mit kernkodierten, plastidären Polypeptiden. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, ob die Poly(A)$^+$-RNA die gesuchten Informationsträger beinhaltete und in welcher der RNA-Fraktionen diese in angereicherter Form auftraten. Die Prozedur wurde gemäß II.E.4. durchgeführt.

II.C. Synthese und Klonierung doppelsträngiger DNA (dscDNA) nach der "Homopolymer-Methode"

II.C.1. Reagenzien und Pufferlösungen

Desoxynukleotide	(dNTP)	:	Boehringer
Dithiothreitol	(DTT)	:	Serva
Kakodylsäure	(Natriumsalz)	:	Serva
Oligo$(dT)_{10}$	(Lithiumsalz)	:	P.L. biochemicals
Oligo$(dG)_{12-18}$	(Ammoniumsalz)	:	Boehringer
(α ^{32}P)-dATP	(10 mCi/ml)	:	Amersham
^{3}H-dCTP und ^{3}H-dGTP	(21 Ci/mmol)	:	Amersham
Terminaltransferase	(TpT)	:	BRL
Reverse Transkriptase	(RVT)	:	Dr. J.W.Beard (Florida)

RVT-Puffer (5x)	(pH 8,3)	:	250 mM Tris/HCl 300 mM NaCl 30 mM $MgCl_2$
Neutralisationslösung		:	40 mM Tris 0,3 N HCl
Puffer D	(pH 8,0)	:	10 mM Tris/HCl 0,5 mM EDTA 10 mM NaCl
Puffer C	(pH 7,5)	:	10 mM Tris/HCl 0,1 mM EDTA
Kopplungspuffer	(pH 7,5)	:	10 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Kakodylatpuffer (5x)	(pH 7,6)	:	300 mM Tris/HCl 700 mM Na-Kakodylat

II.C.2. Synthese einzelsträngiger, komplementärer DNA (sscDNA)

Polyadenylierte mRNA diente bei der Synthese einzelsträngiger cDNA als Matrize. Diese enzymatische Reaktion wurde durch die AMV-Reverse Transkriptase (RVT) katalysiert (Verma, 1977). Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten :

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
RVT-Puffer	5 x	50,0
dATP	25 mM	5,0
dCTP	25 mM	10,0
dGTP	25 mM	10,0
dTTP	25 mM	10,0
DTT	400 mM	12,5
steriles Wasser	-	86,5
$Oligo(dT)_{10}$	0,1 mg/ml	25,0
(α ^{32}P)-dATP	10 mCi/ml	5,0
$Poly(A)^+$-RNA	50 OD (260 nm)/ml	26,0
Reverse Transkriptase	14000 U/ml	10,0
		250,0

Nach einer Inkubationszeit von 1 Std bei 42°C wurde die Reaktion durch 500 mM NaCl, 20 mM EDTA und 0,2 % SDS (Endkonzentrationen) gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz einmal mit Phenol/Chloroform (1:1, v/v) und einmal nur mit Chloroform extrahiert. Die Syntheseprodukte konnten dann durch Zugabe von 0,1 Vol. einer 3 M NaAc-Lösung (pH 6,0) und 3 Vol. Ethanol bei -70°C ausgefällt werden. Das Nukleinsäuresediment wurde in 50 µl einer 0,3 N NaOH-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 60°C inkubiert (RNA-Hydrolyse). Dem Ansatz wurden dann 50 µl Neutralisationslösung hinzugefügt. Die freien Nukleotide wurden chromatographisch aus dem Hydrolyseansatz, unter Verwendung einer Sephadex-G100 Säule, entfernt. Das Säulenmaterial wurde vor Gebrauch autoklaviert (als wässrige Suspension) und dann in eine sterile Pasteurpipette gegeben. Zur Äquilibrierung wurde die Säule mit 5 ml Puffer D durchspült. Der Hydrolyseansatz konnte direkt auf die Säule auf-

getragen und die sscDNA mit Puffer D eluiert werden. Die sscDNA wurde mit Ethanol aus dem Eluat gefällt, gewaschen und in 100 µl sterilem Wasser aufgenommen.

II.C.3. 3'-terminale Elongation der sscDNA mit ^{3}H-dCTP

Die Synthese doppelsträngiger cDNA (dscDNA) setzte die 3'-terminale Elongation mit dCTP voraus. Die Reaktion wurde durch die Terminaltransferase (Roychoudhury et al., 1976; Villa-Komaroff et al., 1978; Röwekamp und Firtel, 1980) unter folgenden Bedingungen katalysiert :

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Na-Kakodylatpuffer	5 x	40,0
$CoCl_2$	10 mM	20,0
dCTP	4 mM	4,0
steriles Wasser	-	36,0
		100,0

Dieser Teilansatz wurde auf getrocknetes ^{3}H-dCTP (100 µCi, spez. Aktivität: 21 Ci/mmol) pipettiert und die in Wasser gelöste sscDNA hinzugefügt. Der Gesamtansatz wurde dann für 5 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend in Eiswasser abgekühlt. Durch die Zugabe von 66 U Terminaltransferase wurde die Reaktion gestartet. Diese Hauptinkubation erfolgte bei 15-16°C für 6-7 min. Hiernach mußte die Reaktion sehr schnell durch 10 mM EDTA und 500 mM NaCl (Endkonzentrationen) gehemmt werden. Zusätzlich wurde der Ansatz für 5 min bei 65°C inkubiert. Die nachfolgende Phenolisierung und Fällung wurde bereits beschrieben (II.B.2.). Das sscDNA-Sediment wurde für die Synthese des komplementären DNA-Stranges in 100 µl Puffer C aufgenommen.

II.C.4. Synthese doppelsträngiger, komplementärer DNA (dscDNA)

Für die Synthese des zweiten DNA-Stranges galten ähnliche Bedingungen wie für die Synthese der sscDNA selbst. Die Reaktion wurde ebenfalls durch die Reverse Transkriptase (RVT) katalysiert :

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
RVT-Puffer	5 x	60,0
Oligo(dG)$_{12-18}$	300 µg/ml	30,0
sscDNA	10 µg/ml	100,0
steriles Wasser	-	8,0
$MgCl_2$	1 mM	10,0
		208,0

Dieser Teilansatz wurde für 5 min bei 65°C vorinkubiert, dann über 30 min bis auf 42°C abgekühlt und anschließend in ein Eisbad überführt. Der Teilansatz wurde durch folgende Komponenten ergänzt :

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Teilansatz (s.o.)	-	208,0
DTT	10 mM	30,0
dATP	1 mM	12,0
dCTP	1 mM	12,0
dTTP	1 mM	12,0
dGTP	1 mM	12,0
(α ^{32}P)-dATP	10 mCi/ml	1,0
		287,0

Zuletzt wurden 140 U Reverse Transkriptase (10 µl) hinzugefügt und der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Nach der Stoppreaktion (vgl. II.C.2.) wurde die Probe phenolisiert und gereinigt (Sephadex-G100).

II.C.5. 3'-terminale Elongation der dscDNA mit ^{3}H-dCTP

Für die 3'-terminale Elongation der dscDNA galten die gleichen Bedingungen wie für die Reaktion mit der sscDNA. Jedoch wurde die Hauptinkubation bei 37°C statt bei 15-16°C durchgeführt. Die Nachbehandlung der dscDNA entsprach jener unter II.C.3. Die gereinigte dscDNA wurde dann in Kopplungspuffer aufgenommen (Enkonzentration : 1 µg/ml).

II.C.6. Vorbereitung des Vektors pBR322 für die Klonierung der dscDNA

Die Vektor-DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease PstI linearisiert und über ein präparatives Agarosegel gereinigt (vgl. II.N.4. und II.N.5.). Die linearisierte Vektor-DNA ließ sich durch Elektroelution aus dem Gel zurückgewinnen (vgl. II.N.6.). Die Agaroserückstände wurden chromatographisch über Sephadex-G100 entfernt (vgl. II.N.7.2.). Für die Insertion der dscDNA in den linearisierten pBR322-Vektor mußte die Vektor-DNA an ihren 3'-Enden mit ^{3}H-dGTP verlängert werden. Diese Prozedur entsprach der Elongation der dscDNA mit dCTP (vgl. II.C.5.). Die fertige Vektor-DNA wurde dann in Kopplungspuffer gelöst (Endkonzentration : 2 µg/ml).

II.C.7. Klonierung der dscDNA im Vektor pBR322

II.C.7.1. Verknüpfung von dscDNA und Vektor-DNA

Der Reaktionsansatz zur Verknüpfung der DNA-Komponenten (s.u.) wurde für 5 min bei 68°C inkubiert, dann sehr langsam (innerhalb von 5-6 Std) auf 32°C abgekühlt und anschließend bei -20°C eingefroren.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
linearisierter Vektor	2 µg/ml	25,0
dscDNA	1 µg/ml	10,0
Kopplungspuffer	1 x	15,0
		50,0

II.C.7.2. Anzucht der Bakterienzellen

Für die Vorbereitung der Bakterienzellen zur Transformation wurde die $CaCl_2$-Prozedur verwendet (Mandel und Higa, 1970; Dagert und Ehrlich, 1979). Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes DH1 wurde von einer Agarplatte in 2 ml LB-Medium transferiert und für 4-5 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die 2 ml Vorkultur wurde nun in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD (550 nm) von 0,2 kultiviert. Diese Hauptkultur wurde dann in Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden anschließend durch eine Zentrifugation sedimentiert und in 20 ml eiskalter $CaCl_2$-Lösung (0,1 M $CaCl_2$) suspendiert. Nach 20 min bei 4°C wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert, dann in 1 ml $CaCl_2$-Lösung aufgenommen und für 12 Std bei 4°C gelagert.

II.C.7.3. Transformation und Plattierung

Zur Transformation wurden 25 µl (30 ng DNA) des Verknüpfungsansatzes (vgl. II.C.7.1.) mit 0,2 ml der vorbehandelten Zellsuspension versetzt und zunächst für 10 min bei 4°C vorinkubiert. Die Hauptinkubation erfolgte dann für 5 min bei 37°C. Anschließend wurde der Ansatz durch 4 ml LB-Medium ergänzt und im Schüttler bei 37°C über 60 min inkubiert. Die Bakterien wurden dann sedimentiert und in 0,4 ml LB-Medium resuspendiert. Von dem Transformationsansatz wurden jeweils 100 µl auf einer ENB-Platte (mit 5 µg Tetracyclin/ml) ausgestrichen. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden ausgezählt, vereinzelt und als Stammkulturen in Lagermedium bei 4°C aufbewahrt.

LB-Medium :	Hefe-Extrakt	5 g/l			
	Bacto-Trypton	10 g/l			
	NaCl	10 g/l	ENB-Medium :	Nutrient-Broth	8 g/l
				Bacto-Pepton	5 g/l
Lagermed. :	KH_2PO_4	3 g/l		Glukose	1 g/l
	K_2HPO_4	7 g/l		KH_2PO_4	1,5 g/l
	Na-Citrat	0,5 g/l		Na_2HPO_4	3,5 g/l
	$MgSO_4$	0,1 g/l		NaCl	5 g/l
	Glyzerin	0,5 l/l		Difco-Agar	15 g/l

II.D. Synthese und Klonierung doppelsträngiger DNA (dscDNA) nach der "Linker-Methode"

II.D.1. Reagenzien und Pufferlösungen

Desoxynukleotide	:	Boehringer
Oligo(dT)$_{12-18}$ (Ammoniumsalz)	:	Boehringer
RNAsin	:	BRL
Dithiothreitol (DTT)	:	Serva
Spermidin	:	Sigma
Reverse Transkriptase	:	Dr. J.W.Beard (Florida)
T4-Polynukleotidkinase	:	Boehringer
DNA-Polymerase I	:	Boehringer
Klenow-Fragment	:	Boehringer
EcoRI-Methylase	:	Biolabs
S_1-Nuklease	:	Boehringer
T4-DNA Ligase	:	Boehringer
T4-RNA Ligase	:	Boehringer
EcoRI-Endonuklease	:	Boehringer

Tris-Puffer I	:	500 mM Tris/HCl	(pH 8,3)
Tris-Puffer II	:	1000 mM Tris/HCl	(pH 7,4)
Tris-Puffer III	:	1000 mM Tris/HCl	(pH 8,0)
Stopp-Lösung	:	3 M NaCl 150 mM EDTA 1,2 % SDS	
TE-Puffer	:	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA	(pH 7,5)
Phenol (puffergesättigt)	:	Phenol gesättigt mit TE-Puffer	

S_1-Nukleasepuffer (10x)	:	500 mM NaAc/HAc	(pH 7,5)
		2 M NaCl	
		10 mM $ZnSO_4$	
		5 % Glyzerin (v/v)	
Kinase-Puffer (10x)	:	660 mM Tris/HCl	(pH 7,6)
		10 mM ATP	
		10 mM Spermidin	
		100 mM $MgCl_2$	
		150 mM DTT	
TEN-Puffer	:	10 mM Tris/HCl	(pH 8,0)
		300 mM NaCl	
		1 mM EDTA	
Ligationspuffer (10x)	:	500 mM Tris/HCl	(pH 7,4)
		100 mM $MgCl_2$	
		100 mM Dithiothreitol (DTT)	
		10 mM Spermidin	
		10 mM ATP	
		1 mg BSA/ml	
Sepharose-Puffer	:	50 mM Tris/HCl	(pH 8,0)
		300 mM NaCl	
		1 mM EDTA	
Elektrophoresepuffer	:	30 mM NaOH	
		0,2 mM EDTA	

II.D.2. Synthese einzelsträngiger, komplementärer DNA (sscDNA)

Die Synthese der sscDNA wird wie bei der "Homopolymer-Methode" durch die Reverse Transkriptase katalysiert. Als Matrize diente ebenfalls polyadenylierte mRNA von Spinat.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Tris-Puffer I	500 mM	10,0
steriles Wasser	-	15,0
KCl	1,0 M	5,0
$MgCl_2$	100 mM	8,0
DTT	100 mM	1,0
dATP	10 mM	10,0
dGTP	10 mM	10,0
dCTP	10 mM	10,0
dTTP	10 mM	3,0
$Oligo(dT)_{12-18}$	1 µg/ml	3,0
BSA	2 mg/ml	10,0
Actinomycin D	1 mg/ml	3,0
RNAsin	5 U/µl	3,0
(α ^{32}P)-dTTP	10 mCi/ml	5,0
Poly(A)$^+$-RNA	175 OD(260)/ml	1,0
Reverse Transkriptase	14000 U/ml	1,5
		98,5

Die sscDNA-Synthese wurde durch die Zugabe der Reversen Transkriptase gestartet und zunächst für 5 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 10 min bei 37°C inkubiert und dann im Wasserbad auf 42°C aufgeheizt. Bei dieser Reaktionstemperatur erfolgte die Hauptinkubation für 30 min. Dem Ansatz wurden dann nochmals 1,5 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und die Reaktion um weitere 30 min verlängert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 17 µl Stopp-Lösung ge-

hemmt. Nach der Phenolisierung des Reaktionsansatzes mit 1 Vol. puffergesättigtem Phenol wurde der Ansatz mit 4,4 µl einer 10 M NaOH-Lösung versetzt (RNA-Hydrolyse) und für 1-2 Std bei 25°C (oder über Nacht bei Raumtemperatur) inkubiert. Die freien Nukleotide wurden unter Verwendung einer Sephadex-G100 Säule (II.N.7.2.) von der sscDNA getrennt. Die sscDNA wurde mit Ethanol aus dem Säuleneluat präzipitiert, sedimentiert und in 50 µl einer 50 mM NaOH-Lösung gelöst. Der Ansatz wurde dann mit 1 N HAc (4,8 µl 1 N HAc/100 µl NaOH-Lösung) neutralisiert. Die sscDNA wurde erneut präzipitiert, gewaschen und in 31 µl sterilem Wasser gelöst.

II.D.3. Synthese doppelsträngiger, komplementärer DNA (dscDNA)

Die Synthese der dscDNA wurde durch die DNA-Polymerase I (endonukleasefrei) oder das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I katalysiert :

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Tris-Puffer II	1,0 M	4,0
KCl	1,0 M	14,0
$MgCl_2$	1,0 M	2,0
DTT	100 mM	10,0
dATP	10 mM	20,0
dGTP	10 mM	20,0
dCTP	10 mM	20,0
dTTP	10 mM	20,0
BSA	2 mg/ml	12,0
sscDNA (in Wasser)	-	31,0
steriles Wasser	-	40,0
Klenow-Fragment	5000 U/ml	7,0
		200,0

Der Reaktionsansatz zur Synthese des dscDNA-Stranges wurde zunächst ohne das Klenow-Fragment für 15 min bei 15°C vortemperiert. Hiernach wurden 35 U Klenow-Fragment (7 ul) hinzugefügt und der Ansatz dann über 20 Std bei 15°C

inkubiert. Durch die Zugabe von 4 µl DNA-Polymerase I (20 U) wurde die zweite Phase der dscDNA-Synthese eingeleitet, die bei 21°C über 3 Std durchgeführt wurde. Die Reaktion wurde dann mit 1 Vol. puffergesättigtem Phenol und 1 Vol. Chloroform gestoppt. Nach einer weiteren Behandlung mit Chloroform (1 Vol.) wurde die dscDNA mit Ethanol aus der wässrigen Phase präzipitiert, dann sedimentiert, gewaschen (zweimal mit 80% Ethanol) und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die freien Nukleotide wurden wiederum chromatographisch entfernt (Sephadex-G100 Säule). Die dscDNA wurde aus dem Eluat präzipitiert, gewaschen und zur Methylierung in 60 µl Wasser aufgenommen.

II.D.4. Methylierung der dscDNA

Die dscDNA wird in einer späteren Reaktion für die Klonierung im Lambda-Vektor gt11 mit EcoRI-Linkermolekülen versehen. Damit die dscDNA jedoch klonierbar wird, muß sie mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt werden, wobei die addierten Linkermoleküle restringiert und 5'-überhängende, einzelsträngige Enden erzeugt werden. Die dscDNA muß bei dieser Reaktion vor der EcoRI-Restriktion geschützt sein. Daher wird die dscDNA vor der Addition der Linkermoleküle an den entsprechenden Schnittstellen enzymatisch methyliert. Die Reaktion wurde durch die EcoRI-Methylase katalysiert :

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Tris-Puffer III	1,0 M	4,5
dscDNA (42% der dscDNA)	-	25,0
EDTA	100 mM	4,5
S-Adenosyl-Methionin	10 mM	1,5
BSA	2 mM/ml	4,5
steriles Wasser	-	3,5
EcoRI-Methylase	10000 U/ml	1,5
		45,0

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der EcoRI-Methylase gestartet und für 1 Std bei 37°C durchgeführt. Der Ansatz wurde dann für 5 min bei 68°C er-

hitzt. Die methylierte dscDNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert, sedimentiert, gewaschen und in 50 µl Wasser aufgenommen. Der Methylierung folgte die S_1-Nukleasereaktion.

II.D.5. S_1-Nukleasebehandlung der methylierten dscDNA

Vor der Addition der EcoRI-Linker müssen die dscDNA-Fragmente einer S_1-Nukleasebehandlung unterzogen werden, um glatte DNA-Enden zu erzeugen mit denen die Linkermoleküle verknüpft werden können.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
S_1-Nukleasepuffer	10 x	10,0
steriles Wasser	-	35,0
dscDNA (methyliert)	-	50,0
S_1-Nuklease	10 U/µl	5,0
		100,0

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurden dem Ansatz 6 µl einer 1 M Tris/HCl-Lösung (pH 7,4) hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe mit 1 Vol. puffergesättigtem Phenol und 1 Vol. Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase konnte danach, zur Reinigung der dscDNA, unmittelbar auf eine Sephadex-G100 Säule aufgetragen werden. Die dscDNA wurde dann aus dem Säuleneluat präzipitiert, sedimentiert, gewaschen und in 35 µl sterilem Wasser aufgenommen.

II.D.6. Nachbehandlung der dscDNA mit dem Klenow-Fragment

Der S_1-Nukleasebehandlung folgte eine Nachbehandlung der dscDNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Hierbei wurden einzelsträngige DNA-Enden enzymatisch zum Doppelstrang ergänzt bzw. abgebaut, so daß DNA-Fragmente mit glatten Enden entstanden.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Tris-Puffer II	1,0 M	2,5
$MgCl_2$	100 mM	3,5
DTT	50 mM	1,0
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	je 2 mM	je 1,5
steriles Wasser	-	2,0
dscDNA	-	35,0
Klenow-Fragment	5000 U/ml	1,0
		51,0

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 22°C inkubiert und anschließend mit 2 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 7,0) und 6 µl einer 4 M NaCl-Lösung versetzt. Nach der Phenolisierung des Reaktionsansatzes und der Reinigung der dscDNA über Sephadex-G100 (vgl. II.N.7.2.) wurde die dscDNA aus dem Säuleneluat gefällt und in 6,4 µl TE-Puffer aufgenommen.

II.D.7. Addition von phosphorylierten EcoRI-Linkern an die dscDNA

Die käuflich erworbenen EcoRI-Linker mußten vor ihrer Verknüpfung mit der dscDNA phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch die T4-Polynukleotidkinase katalysiert. Das Enzym transferiert dabei das γ-Phosphat des ATP an den 5'-OH Terminus der Linkermoleküle (Richardson et al., 1971).

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Kinase-Puffer (mit ATP)	10 x	1,0
steriles Wasser	-	5,0
BSA	2 mg/ml	1,5
EcoRI-Linker	2,5 µg/µl	1,0
T4-Polynukleotidkinase	10000 U/ml	1,5
		10,0

Die Phosphorylierungsreaktion wurde bei 37°C durchgeführt. Nach 1 Std war die Reaktion abgeschlossen und der Ansatz wurde dann bis zu seiner Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

In der anschließenden Ligation wurden die phosphorylierten EcoRI-Linker mit der dscDNA verknüpft. Der Reaktionsansatz enthielt 2,5 µg Linker-DNA und ca. 0,4 µg dscDNA. Die Reaktion wurde durch die T4-DNA Ligase (Weiss et al., 1968) und die T4-RNA Ligase (Sugino et al., 1977) katalysiert.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Kinase-Puffer (ohne ATP)	10 x	1,0
EcoRI-Linker (phosphoryliert)	0,25 µg/µl	10,0
dscDNA (in TE-Puffer)	-	6,4
ATP	10 mM	0,6
T4-DNA Ligase	2000 U/ml	1,0
T4-RNA Ligase	3000 U/ml	1,0
		20,0

Der Ligationsansatz wurde für 15 Std bei 12°C inkubiert und dann mit 30 µl TEN-Puffer versetzt. Nach einer abschließenden Phenolisierung des Ansatzes (vgl. II.D.3.) wurde die dscDNA präzipitiert, sedimentiert, gewaschen und in 90 µl Wasser aufgenommen.

II.D.8. EcoRI-Restriktion der dscDNA

Die gelinkerte dscDNA muß vor ihrer Insertion in den Klonierungsvektor λgt11 mit der Restriktionsendonuklease EcoRI behandelt werden, wobei die addierten Linkermoleküle restringiert und 5'-überhängende, einzelsträngige Enden erzeugt werden. Dazu wurde die dscDNA (90 µl) mit 110 U EcoRI in einem Reaktionsansatz von 100 µl für 2 Std bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 50 mM EDTA (Endkonz.) gestoppt und nach der Zugabe von 7,5 µl einer 4 M NaCl-Lösung phenolisiert (vgl. II.D.3.). Die dscDNA wurde dann präzipitiert und für die Größenfraktionierung in 200 µl TE-Puffer aufgenommen.

II.D.9. Größenfraktionierung der dscDNA über Sepharose-4B

Die Sepharose-4B wurde über Nacht in Sepharose-Puffer äquilibriert. Das Sepharosematerial wurde dann in eine 5 ml Glaspipette gegeben (Bettvolumen etwa 5 ml) und mit 5-10 ml Sepharose-Puffer gespült. Hiernach wurde die dscDNA (in 200 µl TE-Puffer) auf die Säule aufgetragen und mit Sepharose-Puffer eluiert. Das Säuleneluat wurde in 150 µl Fraktionen aufgefangen. Die drei ersten Fraktionen enthielten cDNA-Fragmente, deren etwaige Größen auf einem 1,5%-igen Agarosegel abgeschätzt wurden. Die dscDNAs der einzelnen Fraktionen wurden gefällt, gewaschen und jeweils in 30 µl sterilem Wasser aufgenommen.

II.D.10. Ligation der dscDNA mit dem Lambda-Vektor gt11

Der Klonierungsvektor λgt11 wurde entsprechend II.K.3. präpariert und für die Klonierung mit der Restriktionsendonuklease EcoRI restringiert (vgl. II.N.4.). Der Vektor λgt11 enthält nur eine EcoRI-Schnittstelle, so daß bei der Restriktion zwei DNA-Fragmente entstehen, zwischen die bei der Ligation die dscDNA inseriert wird.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Ligationspuffer	10 x	0,5
steriles Wasser	-	1,5
Vektor-DNA (λgt11)	200 ng/µl	1,0
dscDNA	2 ng/µl	1,0
T4-DNA Ligase	2000 U/ml	1,0
		5,0

Der Ligationsansatz (5 µl) enthielt ca. 20 ng dscDNA und 200 ng Vektor-DNA. Die Ligation wurde mit den dscDNAs aller Sepharose-4B Säulenfraktionen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 µl der in 30 µl gelösten cDNAs (s.o.) eingesetzt. Um das Volumen des Ligationsansatzes von 5 µl nicht zu überschrei-

ten, wurde die dscDNA getrocknet und dann in 1 µl Wasser zurückgelöst. Der Ligationsansatz wurde zunächst für 1 Std bei Raumtemperatur und anschließend für 12-14 Std bei 16°C inkubiert. Hiernach wurde für die folgende Verpackung der ligierten DNA dem Ansatz 1,0 µl (20%) entnommen. Der Rest des Ligationsansatzes wurde bei -20°C gelagert.

II.D.11. Verpackung, Plattierung und Selektion rekombinanter Phagen

Zur *in vitro* Verpackung der ligierten DNA wurde 1,0 µl des Ligationsansatzes (ca. 40 ng DNA) eingesetzt. Die Verpackungsreaktion und die Nachbehandlung der Phagenpartikel ist unter II.K.4.5. beschrieben.

Für die Plattierung der Phagen wurden Wirtsbakterien angezogen und für die Infektion vorbereitet (vgl. II.K.2.1.). Als Wirtsbakterium diente der Stamm Y 1088. Der Verpackungsansatz war in der Nachbehandlung mit SM-Medium auf 0,5 ml verdünnt worden (vgl. II.K.4.5.). Hiervon wurden 1, 5 und 10 µl mit einer geeigneten Menge an Wirtsbakterien inkubiert und plattiert (II.K.2.2.). Das Plattierungsmedium (LAMg-Medium) enthielt zusätzlich die Komponenten X-Gal und IPTG (200 µg X-Gal und 160 µg IPTG pro ml LAMg-Medium). Die beiden Zusätze wurden erst kurz vor der Plattierung dem LAMg-Medium hinzugefügt. Die Platten wurden dann für 12-14 Std bei 37°C inkubiert. Phagenpartikel, die rekombinante DNA trugen, bildeten weiße Plaques, wohingegen blaue Plaques solche Phagen enthielten, die ausschließlich Vektor-DNA besaßen.

II.D.12. Alkalische Agarosegelelektrophorese

Die jeweiligen Produkte der sscDNA- und der dscDNA-Synthese sowie die Produkte der S_1-Nukleasereaktion wurden hinsichtlich ihrer Größe und Qualität untersucht. Dazu wurden 1,5%-ige, alkalische Agarosegele verwendet, die 300 µl einer 10 M NaOH-Lösung und 40 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 7,5) pro 100 ml Agaroselösung enthielten (denaturierende Bedingungen). Es wurden sowohl vertikale, als auch horizontale Elektrophoresen durchgeführt. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0,03 N NaOH und 0,2 mM EDTA. Die Gele wurden nach der Elektrophorese in einer 7,5%-igen TCA-Lösung fixiert (10 min), anschließend gewässert, getrocknet und zur Exposition mit Röntgenfilm belegt.

II.E. RNA-Selektion und Immunpräzipitation

II.E.1. Reagenzien und Pufferlösungen

^{35}S-Methionin (10 µCi/µl)	:	Amersham
Sephacryl S-500	:	Pharmacia
Retikulocytenlysat (Kaninchen)	:	Amersham
Pankreas-RNAase	:	Boehringer
Röntgenfilm (XOmat AR-Film)	:	Kodak

Boratpuffer	:	50 mM Na-Borat	(pH 8,0)
Hybridisationsmedium (RNA-Selektion)	:	20 mM Pipes	(pH 6,4)
		1 mM EDTA	
		0,6 M NaCl	
		0,2 % SDS	
		50 % Formamid (v/v)	
Waschpuffer (RNA-Selektion)	:	2 x SSC	
		0,2 % SDS	
		50 % Formamid (v/v)	
Tris/EDTA-Medium	:	10 mM Tris/HCl	(pH 8,0)
		2 mM EDTA	
SSC-Lösung (1x)	:	150 mM NaCl	
		15 mM Na-Citrat	
RNAase-Lösung	:	60 mM EDTA	(pH 6,0)
		20 µg RNAase/ml	
Protease-Inhibitoren	:	1 mM TLCK	
		1 mM TPCK	
		1 mM PMSF	

Immunpräzipitationspuffer	:	100 mM Tris/HCl	(pH 8,0)
		600 mM NaCl	
		10 mM EDTA	
		2 % Triton X-100	
		0,02 % NaN_3	
Waschpuffer (Immunpräzipitation)	:	50 mM Tris/HCl	(pH 8,0)
		300 mM NaCl	
		1 % Triton X-100 (w/v)	
		0,1 % SDS	
		0,02 % NaN_3	
SDS-Denaturierungspuffer	:	125 mM Tris/HCl	(pH 6,8)
		2,5 % SDS	
		10 % Glyzerin	
		0,001 % Bromphenolblau	
Färbelösung (Proteine)	:	50 % Methanol (v/v)	
		7 % Essigsäure (v/v)	
		0,25 % Coomassie Brilliant Blue	
Entfärbelösung (Proteine)	:	50 % Methanol (v/v)	
		7 % Essigsäure (v/v)	
Molekulargewichtsreferenzen	:	67 kd Rinderserumalbumin	
		43 kd Ovalbumin	
		26 kd Chymotrypsin	
		20 kd Trypsin-Inhibitor	
		14 kd Lysozym	

II.E.2. Kupplung von Plasmid-DNA an APTE-Sephacryl S-500

Die Aufarbeitung der cDNA-Bücherei erfolgte in mehreren Schritten. Von den ca. 2000 Stammkulturen wurden jeweils 100 als 50 ml Kulturen in LB-Medium (+ Tetracyclin) angezogen. Die 100 verschiedenen Klone konnten nicht in einem gemeinsamen Ansatz kultiviert werden, da sie sehr unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten zeigten. Die Bakterien aus 10 Kulturen wurden jeweils zusammengefaßt und die Plasmide isoliert (vgl. II.N.3.). Zur Identifizierung der cDNA-Klone wurde die von Bünemann et al. (1982) beschriebene Hybridselektionsmethode verwendet. Sie ermöglicht die Extraktion von RNA-Spezies aus einer komplexen RNA-Population durch die Hybridisierung mit denaturierter, matrixfixierter, komplementärer DNA. Die Methode ist von hoher Spezifität und daher vielfach verwendet worden.

Zunächst wurde das Diazophenylthioäther (APTE)-Sephacryl S-500 mit $NaNO_2$-Lösung diazotiert. Dazu wurden 3 g APTE-Sephacryl S-500 in einer Glasfritte mit 100 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde dann in 13 ml 1,4 N HCl suspendiert und in Eis abgekühlt. In Abständen von 6 min wurden der Suspension jeweils 100 µl $NaNO_2$-Lösung (Stammkonz.: 10 mg/ml) hinzugefügt. Da das Matrixmaterial sedimentierte, mußte der Reaktionsansatz mehrfach vorsichtig geschüttelt werden. Nach der Zugabe von 400-500 µl Nitritlösung (nach etwa 30 min) war die Diazotierung beendet. Der Diazotierungsansatz wurde dann in eine eiskalte Glasfritte überführt und sehr schnell mit 100 ml eiskaltem Wasser und anschließend mit einer Mischung aus 2 Vol. Boratpuffer und 8 Vol. Dimethylsulfoxid (DMSO) gewaschen. Zur Kupplung von DNA an die aktivierte Sephacrylmatrix wurden 50-100 ug Plasmid-DNA in 0,5 ml TE-Puffer gelöst und durch Ultraschall fragmentiert. Die beschallte DNA wurde mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und in 150 µl einer Mischung aus 2 Vol. Boratpuffer und 8 Vol. Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Der DNA-Lösung wurden dann 0,3 g aktivierte Matrix hinzugefügt. Der Kupplungsansatz wurde nun über 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

II.E.3. RNA-Selektion mit an Sephacryl S-500 gebundener DNA

II.E.3.1. Vorbehandlung der Matrix vor der ersten Hybridisierung

Um die nicht oder nur schlecht gebundene DNA aus dem Kupplungsansatz zu entfernen, wurde dieser zunächst zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand quantitativ entfernt. Die zurückgebliebene Matrix wurde mit 1 ml Hybridisationsmedium resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Std bei 70°C wurde der Ansatz in eine kleine Plastiksäule (BioRad Econo Säulen) transferiert und zweimal mit je 5 ml 90-100°C heißem Wasser gewaschen. Das Matrixmaterial wurde anschließend in 1 ml Hybridisationsmedium überführt und bei 4°C gelagert.

II.E.3.2. Hybridisierungsprozedur mit Poly(A)$^+$-RNA (Hybridselektion)

Vor der Hybridisierung wurde die Matrix dreimal mit 1 ml Hybridisationsmedium gewaschen. Der letzte Waschungsüberstand mußte möglichst quantitativ abgenommen werden. Der Matrix (mit gebundener DNA) wurden nun 2 µg Poly(A)$^+$-RNA in 100 µl Hybridisationsmedium hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann in 2 ml Nunc-Röhrchen überführt und für 6 Std oder auch über Nacht bei 42°C unter behutsamem, aber ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde der Gefäßinhalt in eine kleine Plastiksäule (s.o.) transferiert und die Flüssigkeit mit der Wasserstrahlpumpe abgesogen. Die Matrix wurde nun fünfmal mit je 5 ml Waschpuffer (auf 42°C vortemperiert) unter Verwendung der Wasserstrahlpumpe durchspült. Der Säuleninhalt wurde anschließend in 1 ml Tris/EDTA-Medium suspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der wässrige Oberstand abgenommen, die Matrix dann in 0,8 ml 90°C heißem Wasser aufgenommen und für 90 sek bei 90°C inkubiert. Der Inhalt des Eppendorfgefäßes mußte nun sehr schnell in eine Plastiksäule überführt werden. Das Poly(A)$^+$-RNA enthaltende Eluat wurde nun in 15 ml Corex-Röhrchen aufgefangen. Zur vollständigen Elution der gebundenen RNA wurde zweimal mit 0,5 ml 90°C heißem Wasser nacheluiert. Diese Eluate wurden mit dem ersten vereinigt. Die Poly(A)$^+$-RNA wurde aus den vereinigten Eluaten mit Ethanol präzipitiert, gewaschen und in 6 µl sterilem Wasser aufgenommen.

II.E.3.3. In vitro Translation der selektierten Poly(A)$^+$-RNA

Für die in vitro Translation der selektierten Poly(A)$^+$-RNA wurde käufliches Kaninchen-Retikulocytenlysat verwendet. Der Translationsansatz (s.u.) wurde für 60 min bei 30^{o}C inkubiert und anschließend zur Restriktion der Poly(A)$^+$-RNA mit 2,5 µl RNAase-Lösung versetzt. Nach 15 min bei 30^{o}C wurde der Ansatz durch 20 µl SDS-Denaturierungspuffer ergänzt und für 30 sek bei 70^{o}C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 µl β-Merkaptoethanol konnten die ^{35}S-markierten Translationsprodukte gelelektrophoretisch analysiert werden.

Reaktionskomponente	Volumina (in µl)
Poly(A)$^+$-RNA	2,0 (entspricht 0,1 µg Poly(A)$^+$-RNA)
^{35}S-Methionin	1,0
Retikulocytenlysat	8,0
	11,0

II.E.3.4. Fraktionierung der in vitro Translationsprodukte

Für die Analyse der Translationsprodukte wurden 10-15%-ige Polyacrylamid-Gradientengele mit 5%-igen Polyacrylamid-Sammelgelen verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Gelelektrophorese) nach Laemmli (1970). Der nachbehandelte Translationsansatz konnte direkt auf das Gel aufgetragen werden. Die denaturierten Proteine wurden bei konst. Spannung (150 V) über 16 Std pherographiert. Zur Abschätzung der Molekulargewichte der Translatonsprodukte wurden stets auch Molekulargewichtsreferenzen (vgl. II.E.2.) aufgetragen.

II.E.3.5 Fluorographie

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst für 20 min in eine Färbelösung gebracht, um die Molekulargewichtsreferenzen sichtbar zu machen. Das Gel wurde dann durch eine 3-stündige Behandlung mit Entfärbelösung von

überschüssigem Farbstoff befreit. Die ^{35}S-markierten Translationsprodukte konnten nur fluorographisch sichtbar gemacht werden (Chamberlain et al., 1979). Dazu mußte das Gel zunächst für 20 min gewässert werden. Anschließend wurde es für 25 min in eine Natriumsalicylatlösung (16 g Natriumsalicylat/100 ml) transferiert und dann unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde mit Röntgenfilm belegt und bei -70°C exponiert.

II.E.4. Immunpräzipitation mit Staphylococcus aureus, Stamm Cowan I

Für die Immunpräzipitation mit monospezifischen Antikörpern wurde mit den cDNA-Populationen die 2-3 fache Menge an Poly(A)$^+$-RNA selektiert. Die RNA-Spezies wurden getrennt in vitro translatiert (22 µl Translationsansatz), dann mit 2 µl RNAase-Lösung (20 µg/ml) und 3 µl einer 0,1 M EDTA-Lösung (pH 6,0) versetzt und 15 min bei 30°C inkubiert (vgl. II.E.3.3.). Zur Denaturierung der Proteine wurde der Ansatz auf 2% SDS eingestellt und für 1 min bei 70°C erhitzt. Für die Immunpräzipitation (Westhoff und Zetsche, 1981) wurden dem Ansatz 264 µl Wasser, 6 µl Proteaseinhibitoren und 300 µl Immunpräzipitationspuffer hinzugefügt. Vor der Inkubation mit einem oder mehreren Antikörpern wurde der Ansatz mit 1 µl Präimmunserum und 5 µl Staphylococcensuspension (Kessler et al., 1975) für 45 min bei Raumtemperatur unter Schütteln vorinkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Oberstand vom entstandenen Sediment getrennt und für die Hauptinkubation mit 1-2 µl des entsprechenden Antiserums versetzt. Der Ansatz wurde für 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt und dann durch 5 µl Staphylococcensuspension (10%-ige Suspension) pro 1 µl Antiserum ergänzt und nochmals für 60 min inkubiert. Die Staphylococcen wurden nun abzentrifugiert und der Oberstand aufbewahrt, falls sich eine zweite Immunpräzipitation anschließen sollte. Das Staphylococcensediment wurde dreimal in Waschpuffer suspendiert und anschließend in 1 ml 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen. Die Suspension wurde in ein neues Gefäß transferiert und wiederum zentrifugiert. Der Oberstand wurde verworfen und das Staphylococcensediment in 50 µl SDS-Denaturierungspuffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um den Antigen-Antikörper-Komplex von den Staphylococcen zu lösen. Die Staphylococcen wurden dann abzentrifugiert und der Oberstand wurde für die Gelelektrophorese erhitzt und mit ß-Merkaptoethanol versetzt (vgl. II.E.3.3.).

II.F. Charakterisierung ausgewählter cDNA-Klone durch Sequenzierung

II.F.1. Bestimmung der Größe klonierter cDNA-Fragmente

Für die Klonierung der synthetisierten dscDNA ("Homopolymer-Methode") war der Vektor pBR322 (Bolivar et al., 1977; Sutcliffe, 1978) verwendet worden. Die Ligation der dscDNA erfolgte in die einfach vorhandene PstI-Schnittstelle im Ampicillin-Resistenzlocus. Zur Größenbestimmung der cDNA-Fragmente wurden die entsprechenden Plasmide mit der Restriktionsendonuklease PstI verdaut. Die Restriktionsprodukte wurden dann über ein 1,5%-iges Agarosegel parallel mit 2 Längenstandards (Lambda-DNA mit HindIII und ØX 174 mit Hae III verdaut) pherographiert.

II.F.2. Umklonierung der cDNA-Fragmente in den Vektor pUR222

Die Umklonierung der cDNA-Fragmente erfolgte in den Vektor pUR222 (Rüther et al., 1981). Der Vektor bietet wegen seiner multiplen Klonierungssequenzen erhebliche Vorteile bei der Sequenzierung (s.u.). Für die Umklonierung der cDNA-Fragmente wurden 20-30 µg der entsprechenden Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease PstI verdaut. Das cDNA-Fragment wurde dann durch eine Agarosegelelektrophorese von der Vektor-DNA getrennt, elektroeluiert, anschließend gereinigt (vgl. II.N.7.) und in 5 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Klonierung und die anschließende Selektion erfolgten gemäß II.N.8.3.

II.F.3. Sequenzierung der cDNA-Fragmente

Zur Sequenzierung wurde die Vektor-DNA (pUR222 mit cDNA-Insert) mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert und terminal mit (α ^{32}P)-dATP markiert (II.N.8.1.). Die nun an beiden Enden markierte Vektor-DNA wurde dann mit dem Restriktionsenzym PvuII nachgeschnitten. Dabei entstanden 2 einseitig markierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die über ein Agarosegel voneinander getrennt wurden. Da die Größe des Vektorfragmentes vorhandenen Re-

striktionskarten entnommen werden konnte und die etwaige Größe der cDNA bekannt war, ließ sich das richtige DNA-Fragment leicht identifizieren. Das DNA-Fragment wurde anschließend elektroeluiert und gereinigt (vgl. II.N.6. und II.N.7.). Die Sequenzierung wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt. Die Degradationsprodukte der Sequenzierungsreaktionen (A, A+G, A>C, T+C, C) wurden auf 12%-, 6%- und 4%-igen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen analysiert.

II.G. Hybridisierung identifizierter cDNA-Sequenzen gegen vorselektierte cDNA-Klone

Mit einigen Klonpopulationen wurden mRNA-Spezies selektiert, die bei der in vitro Translation die gleichen Translationsprodukte ergaben wie die bereits isolierten und sequenzierten cDNA-Fragmente. Diese cDNA-Klone wurden durch die Hybridisierung mit den identifizierten cDNA-Fragmenten selektiert.

II.G.1. Trimmen der sequenzierten cDNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen

Die mit PstI exzisierbaren cDNA-Fragmente besaßen an ihren Enden 10-30 bp lange GC-Sequenzen, die bei der cDNA-Synthese ("Homopolymer-Methode") entstanden waren (vgl. II.C.5. und II.C.6.). Diese Homopolymere mußten entfernt werden, da sie die Hybridisierungsspezifität beeinträchtigt hätten. Als Folge der Sequenzierung ergaben sich automatisch die Restriktionskarten der einzelnen cDNA-Fragmente, so daß die zum Trimmen geeigneten Restriktionsenzyme problemlos ermittelt werden konnten (vgl. Karten der cDNA-Fragmente).

II.G.2. Transfer von Bakterienkolonien auf Nitrozellulose und die Hybridisierung mit ^{32}P-markierten cDNA-Fragmenten

Aliquote der Stammkulturen vorselektierter cDNA-Klone (vgl. II.E.2.) wurden in regelmäßiger Anordnung auf quadratische Platten (12x12 cm) mit LB-Medium (mit 5 µg Tetracyclin/ml LB-Medium) übertragen und über Nacht bei 37°C

kultiviert. Nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) wurden die Kolonien dann auf Nitrozellulose transferiert und für die Hybridisierung vorbereitet. Die verschiedenen cDNA-Fragmente, die zur Hybridisierung eingesetzt wurden, besaßen nach dem Trimmen Größen zwischen 120 und 400 bp. Die Fragmente wurden jeweils mit mehreren radioaktiven Nukleotiden terminal markiert (vgl. II.N.8.1.). Die Hybridisierung wurde entsprechend II.L.3. durchgeführt.

II.H. Hybridisierung identifizierter cDNA-Fragmente gegen Poly(A)$^+$-RNA ("Northern Transfer")

II.H.1. Agarosegelelektrophorese von Glyoxal- und Dimethylsulfoxid-denaturierter Poly(A)$^+$-RNA

Etwa 10-30 µg Poly(A)$^+$-RNA wurden nach der Methode von McMaster und Carmichael (1977) mit Glyoxal und DMSO denaturiert. Die denaturierte RNA wurde dann über ein 1%-iges Agarosegel in NaH_2PO_4-Puffer (10 mM, pH 6,55) pherographiert. Zur späteren Größenbestimmung der RNA wurden denaturierte DNA-Längenstandards (Lambda-DNA mit HindIII und ØX 174-DNA mit HaeIII verdaut) mitpherographiert (Carmichael und McMaster, 1980).

II.H.2. Transfer der Poly(A)$^+$-RNA auf Nitrozellulose

Vor dem RNA-Transfer wurde der Teil des Agarosegels mit den DNA-Längenstandards abgetrennt und für 20 min in einer 50 mM NaOH-Lösung inkubiert. Hierbei wurde das DNA-Glyoxaladdukt zerstört, so daß die DNA in einer 2 M NaAc-Lösung (pH 5,0) mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) angefärbt werden konnte. Die Wanderstrecken der unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden wurden gemessen und zur Erstellung einer Eichkurve mit den Größen der DNA-Fragmente (in bp) korreliert (Weber und Osborn, 1969). Die Poly(A)$^+$-RNA wurde nach der Methode von Thomas (1980) in 20 x SSC über 15 Std auf Nitrozellulose transferiert. Die Nitrozellulose wurde anschließend für 2-3 Std bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung wurde mit getrimmten, ^{32}P-markierten cDNA-Fragmenten unter homologen Bedingungen (vgl. II.L.3.) durchgeführt.

II.I. Import zellfrei synthetisierter Polypeptide in isolierte, intakte Spinatchloroplasten

II.I.1. Isolierung intakter Chloroplasten

Die Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinatblättern wurde nach der Methode von Bartlett et al. (1982) durchgeführt. Dazu wurden junge Spinatpflanzen verwendet, die im Gewächshaus kultiviert worden waren. Die Blätter (ca. 100 g) wurden geerntet und mit einer Rasierklinge zunächst grob zerkleinert. Die anschließende Homogenisation des Blattgewebes erfolgte im Waring Blender mit 1 l eiskaltem Isolationsmedium (siehe Bartlett et al., 1982). Nachdem das Homogenat durch vier Lagen Miracloth (Calbiochem. Kalifornien) filtriert worden war, wurden die Chloroplasten bei 4300 x g über 1-2 min sedimentiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen und das Chloroplastensediment in wenig Isolationsmedium resuspendiert. Die Chloroplastensuspension wurde dann auf einen Percollgradienten (10-80%) aufgetragen und für 10 min bei 15000 x g zentrifugiert (Bartlett et al., 1982). Dabei entstanden im Gradienten zwei Banden, wobei die obere Bande vornehmlich gebrochene, die untere hingegen überwiegend intakte Chloroplasten enthielt. Die untere Gradientenbande wurde abgenommen und mit etwa 5 Vol. Isolationsmedium versetzt, um das Percoll zu verdünnen. Die intakten Chloroplasten wurden sedimentiert (4300 x g, 1-2 min), dann in 1 ml Sorbitol/Hepes-Medium (pH 7,7) aufgenommen und im Eisbad gelagert (Bartlett et al., 1982). Vor der Weiterverarbeitung der Chloroplasten wurde der Chlorophyllgehalt spektralphotometrisch bestimmt (Arnon, 1949) und die Chloroplastensuspension dann mit Sorbitol/Hepes-Medium (pH 7,7) auf 4 mg Chlorophyll/ml eingestellt.

II.I.2. Zellfreie Synthese von Polypeptiden im Weizenkeimextrakt

Die Proteinsynthese wurde im zellfreien Translationssystem aus Weizenkeimen, das nach der Methode von Roman et al. (1976) präpariert worden war, in Anwesenheit von ^{35}S-Methionin durchgeführt. Als RNA-Matrize dienten sowohl Gesamt-Poly(A)$^+$-RNA aus Spinat (vgl. II.B.4.), als auch einzelne Spezies der Poly(A)$^+$-RNA, die mit den cDNA-Klonen für SSU, PC und LHCP aus der Gesamt-

kultiviert. Nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) wurden die Kolonien dann auf Nitrozellulose transferiert und für die Hybridisierung vorbereitet. Die verschiedenen cDNA-Fragmente, die zur Hybridisierung eingesetzt wurden, besaßen nach dem Trimmen Größen zwischen 120 und 400 bp. Die Fragmente wurden jeweils mit mehreren radioaktiven Nukleotiden terminal markiert (vgl. II.N.8.1.). Die Hybridisierung wurde entsprechend II.L.3. durchgeführt.

II.H. Hybridisierung identifizierter cDNA-Fragmente gegen Poly(A)$^+$-RNA ("Northern Transfer")

II.H.1. Agarosegelelektrophorese von Glyoxal- und Dimethylsulfoxid-denaturierter Poly(A)$^+$-RNA

Etwa 10-30 µg Poly(A)$^+$-RNA wurden nach der Methode von McMaster und Carmichael (1977) mit Glyoxal und DMSO denaturiert. Die denaturierte RNA wurde dann über ein 1%-iges Agarosegel in NaH_2PO_4-Puffer (10 mM, pH 6,55) pherographiert. Zur späteren Größenbestimmung der RNA wurden denaturierte DNA-Längenstandards (Lambda-DNA mit HindIII und ØX 174-DNA mit HaeIII verdaut) mitpherographiert (Carmichael und McMaster, 1980).

II.H.2. Transfer der Poly(A)$^+$-RNA auf Nitrozellulose

Vor dem RNA-Transfer wurde der Teil des Agarosegels mit den DNA-Längenstandards abgetrennt und für 20 min in einer 50 mM NaOH-Lösung inkubiert. Hierbei wurde das DNA-Glyoxaladdukt zerstört, so daß die DNA in einer 2 M NaAc-Lösung (pH 5,0) mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) angefärbt werden konnte. Die Wanderstrecken der unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden wurden gemessen und zur Erstellung einer Eichkurve mit den Größen der DNA-Fragmente (in bp) korreliert (Weber und Osborn, 1969). Die Poly(A)$^+$-RNA wurde nach der Methode von Thomas (1980) in 20 x SSC über 15 Std auf Nitrozellulose transferiert. Die Nitrozellulose wurde anschließend für 2-3 Std bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung wurde mit getrimmten, ^{32}P-markierten cDNA-Fragmenten unter homologen Bedingungen (vgl. II.L.3.) durchgeführt.

II.I. Import zellfrei synthetisierter Polypeptide in isolierte, intakte Spinatchloroplasten

II.I.1. Isolierung intakter Chloroplasten

Die Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinatblättern wurde nach der Methode von Bartlett et al. (1982) durchgeführt. Dazu wurden junge Spinatpflanzen verwendet, die im Gewächshaus kultiviert worden waren. Die Blätter (ca. 100 g) wurden geerntet und mit einer Rasierklinge zunächst grob zerkleinert. Die anschließende Homogenisation des Blattgewebes erfolgte im Waring Blender mit 1 l eiskaltem Isolationsmedium (siehe Bartlett et al., 1982). Nachdem das Homogenat durch vier Lagen Miracloth (Calbiochem. Kalifornien) filtriert worden war, wurden die Chloroplasten bei 4300 x g über 1-2 min sedimentiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde verworfen und das Chloroplastensediment in wenig Isolationsmedium resuspendiert. Die Chloroplastensuspension wurde dann auf einen Percollgradienten (10-80%) aufgetragen und für 10 min bei 15000 x g zentrifugiert (Bartlett et al., 1982). Dabei entstanden im Gradienten zwei Banden, wobei die obere Bande vornehmlich gebrochene, die untere hingegen überwiegend intakte Chloroplasten enthielt. Die untere Gradientenbande wurde abgenommen und mit etwa 5 Vol. Isolationsmedium versetzt, um das Percoll zu verdünnen. Die intakten Chloroplasten wurden sedimentiert (4300 x g, 1-2 min), dann in 1 ml Sorbitol/Hepes-Medium (pH 7,7) aufgenommen und im Eisbad gelagert (Bartlett et al., 1982). Vor der Weiterverarbeitung der Chloroplasten wurde der Chlorophyllgehalt spektralphotometrisch bestimmt (Arnon, 1949) und die Chloroplastensuspension dann mit Sorbitol/Hepes-Medium (pH 7,7) auf 4 mg Chlorophyll/ml eingestellt.

II.I.2. Zellfreie Synthese von Polypeptiden im Weizenkeimextrakt

Die Proteinsynthese wurde im zellfreien Translationssystem aus Weizenkeimen, das nach der Methode von Roman et al. (1976) präpariert worden war, in Anwesenheit von ^{35}S-Methionin durchgeführt. Als RNA-Matrize dienten sowohl Gesamt-Poly(A)$^+$-RNA aus Spinat (vgl. II.B.4.), als auch einzelne Spezies der Poly(A)$^+$-RNA, die mit den cDNA-Klonen für SSU, PC und LHCP aus der Gesamt-

Poly(A)$^+$-RNA selektiert worden waren (vgl. II.E.3.2.). Die Zusammenstellung des Translationsansatzes erfolgte nach Bartlett et al. (1982). Nach der in vitro Translation wurde der Ansatz zentrifugiert (106000 x g über 1 Std), um die Ribosomen zu sedimentieren. Der Zentrifugationsüberstand wurde bis zur Weiterverwendung im Eisbad gelagert.

II.I.3. Import zellfrei synthetisierter Polypeptide

Für den Import der zellfrei synthetisierten Polypeptide in isolierte Chloroplasten wurde folgender Ansatz erstellt (Bartlett et al., 1982) :

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
Translationsansatz (mit ATP)	-	100
Hepes/KOH (pH 8,0)	1 M	15
Sorbitol	2 M	40
Methionin	250 mM	10
Wasser	-	85
intakte Chloroplasten (in Sorbitol/Hepes-Medium)	-	50
		300

Die intakten Chloroplasten wurden dem Ansatz zuletzt hinzugefügt. Die Chlorophyllkonzentration betrug hierbei 660 µg/ml Reaktionsansatz. Das Reaktionsgefäß wurde dann mit Parafilm verschlossen und unter leichten Schütteln (sonst sedimentieren die Chloroplasten) für 1 Std bei Raumtemperatur im Licht inkubiert.

II.I.4. Präparation löslicher und membranassoziierter Chloroplastenproteine

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz (s.o.) mit 5 ml Sorbitol/Hepes-Medium (pH 7,7) verdünnt und kurz bei 4300 x g zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und das Chloroplastensediment in 0,5 ml Sorbitol/Hepes-Medium (pH 7,7) resuspendiert. Anschließend wurde die Chloroplastensuspension mit 30 µl Trypsin/Chymotrypsin-Lösung (Stammlsg.: je 5 mg Trypsin und Chymotrypsin in 0,33 M Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH (pH 7,7)) versetzt und für 30 min in Eis inkubiert. Dann wurden dem Verdauungsansatz 5 ml Sorbitol/Hepes-Medium, das durch die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), BAM (1 mM) und ACA (5 mM) ergänzt worden war, hinzugefügt. Die Chloroplasten wurden dann sedimentiert und in 5 ml Sorbitol/Hepes-Medium (mit Proteaseinhibitoren) resuspendiert, dann wiederum sedimentiert und abschließend zur Lyse in 800 µl 10 mM Tricin/NaOH (pH 8,0) aufgenommen und geschüttelt. Der Ansatz wurde auf 150 mM NaCl eingestellt und für 15 min bei 12000 x g zentrifugiert. Dabei sedimentierten die Thylakoidmembranen, während die löslichen Stromaproteine, Ribosomen und Fragmente plastidärer Hüllmembranen im Überstand blieben. Der Zentrifugationsüberstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert und mit 100 µl TCA versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden dann sedimentiert und abschließend zweimal mit 80% Aceton gewaschen. Etwa die Hälfte der unter 150 mM NaCl sedimentierten Membranen (s.o.) wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal in 2-3 ml einer 2 M NaBr-Lösung unter vorsichtigem Schütteln gewaschen. Die mit TCA gefällten, löslichen Proteine und die mit NaCl- bzw. NaBr-Lösung gewaschenen Thylakoidmembranen wurden je in 100 µl Na_2CO_3-Lösung (100 mM Na_2CO_3, 10% Saccharose, 10 mM DTT) resuspendiert und kurz beschallt. Zur folgenden Polyacrylamidgelelektrophorese wurden den Beschallungsansätzen je 50 µl entnommen, mit SDS auf 2,5% eingestellt und vor dem Gelauftrag für 30 sek bei 70°C erhitzt.

II.I.5. SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Stroma- und Membranproteine wurden SDS/Harnstoff-Polyacrylamidgele verwendet (Harms et al., 1978). Das Gelsystem bestand aus einem Sammelgel (60 mM Tris/Phosphat (pH 6,7); 5% Polyacrylamid (w/v); 0,08% Bisacrylamid (w/v); 5 M Harnstoff; 0,1% SDS (w/v)) und einem Gradientengel (15-20% Polyacrylamid) mit 400 mM Tris/HCl (pH 8,9), 7 M Harnstoff und 0,1% SDS (w/v). Der Gradient enthielt zur Stabilisation 3-15% Saccharose. Als Elektrophoresepuffer diente eine Lösung aus 50 mM Tris, 384 mM Glycin und 0,1% SDS (w/v).

II.J. Isolation von Zellkernen und Präparation nukleärer DNA

II.J.1. Reagenzien und Pufferlösungen

Nonidet P40	:	BRL
Proteinase K	:	Merck
Percoll	:	Pharmacia
Spermin und Spermidin	:	Sigma

Puffer A (5x)	:	1,250 M Saccharose (pH 6,0) 50 mM MES 50 mM NaCl 25 mM EDTA 100 mM ß-Merkaptoethanol 0,75 mM Spermin 2,50 mM Spermidin 3 % Nonidet P40 (v/v)
Puffer B (pH 6,0)	:	112,6 g Percoll + 29,1 g Puffer A (5x)
Puffer AB (pH 6,0)	:	30,0 g Puffer A + 45,0 g Puffer B
Puffer C (pH 6,0)	:	22,5 g Percoll + 3,0 g Puffer A (5x)
Lysemedium	:	50 mM Tris/HCl (pH 8,3) 50 mM NaCl 100 mM EDTA 0,5 % SDS (w/v)
TE-Puffer	:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA
Gradientenpuffer	:	20 mM Tris/HCl (pH 8,0) 5 mM EDTA 1 M NaCl
Beladungspuffer	:	20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 200 mM KCl

II.J.2. Zellkernisolierung

Die Zellkernisolierung aus Spinatblättern wurde im wesentlichen nach der Methode von Willmitzer und Wagner (1981) durchgeführt. Es wurden jedoch einige Vereinfachungen eingeführt, die die Prozedur verkürzten, die Qualität der nukleären DNA hingegen unverändert ließen. Grundsätzlich galt bei der Zellkernisolierung, daß alle Lösungen autoklaviert worden waren, und daß stets bei 0-4°C gearbeitet wurde.

Das sehr junge Blattmaterial (ca. 100 g) wurde im Verhältnis 1:10 mit eiskaltem Puffer A (w/v) versetzt und mit einem Ultra-Turrax 3-4 mal für 5 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde dann durch 3 Lagen 100 µm Gaze und 3 Lagen 20 µm Gaze filtriert, um Geweberückstände abzutrennen. Aus dem Filtrat wurden die Zellkerne durch Zentrifugation (600 x g, 5 min) sedimentiert. Der dunkelgrüne, chlorophyllhaltige Oberstand wurde dekantiert und verworfen. Zur weiteren Reinigung der Kerne wurde das weiße Sediment in 25 ml Puffer AB aufgenommen, anschließend in sterile Corex-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 x g (Sorvall-Zentrifuge; Rotor HB-4) zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in 1 ml Puffer A (ohne Nonidet P40) aufgenommen und im Eisbad gelagert. Der Oberstand wurde in ein neues Corex-Röhrchen transferiert, vorsichtig gemischt und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Kerne wurden wiederum in 1 ml Puffer A (ohne Nonidet P40) aufgenommen und im Eisbad gelagert. Diese Prozedur wurde 3-4 mal wiederholt. Die entstehenden Kernsedimente wurden stets im Lichtmikroskop auf ihre Qualität überprüft. Nur die reinsten Sedimente wurden vereinigt und mit Puffer A (ohne Nonidet P40) auf 10 ml ergänzt. Die Zellkerne wurden abermals sedimentiert (5 min bei 600 x g) und dann für die letzte Reinigung in 10 ml Puffer C aufgenommen. In Puffer C war die Percollkonzentration so gewählt worden, daß die Kerne bei einer Zentrifugation (4500 x g, 5 min) flotierten. Die Zellkerne wurden dann mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal in jeweils 10 ml Puffer A gewaschen. Das gewaschene Kernsediment wurde abschließend in 0,5 ml Puffer A/Glyzerin (1:1, v/v) resuspendiert und bei -20°C gelagert.

II.J.3. DNA-Extraktion aus isolierten Zellkernen

Zellkerne, die bei -20°C gelagert waren, mußten vor der DNA-Extraktion zunächst dreimal mit jeweils 10 ml Puffer A (ohne Nonidet P40) gewaschen werden. Das letzte Sediment wurde in 1 ml Puffer A aufgenommen und tropfenweise in 5 ml Lysemedium überführt. Nachdem alle Kerne lysiert waren (die Viskosität der Lösung erreichte ein Maximum), wurde der Ansatz mit 5 mg Proteinase K über 2 Std bei 56°C inkubiert. Nach einer Phenolisierung wurde die nukleäre DNA präzipitiert (vgl. II.B.2.).

II.J.4. Reinigung der nukleären DNA über einen CsCl-Gradienten

Die nukleäre DNA wurde in 5 ml TE-Puffer gelöst und mit 19 ml CsCl-Lösung (1,66 g CsCl/ml TE-Puffer) vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde dann mit weiteren 14 ml TE-Puffer sowie 100 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg) versetzt und hiernach in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation über 18 Std bei 42000 Upm und 18°C (Beckman-UZ, Rotor VTi 50) wurde die unter UV-Bestrahlung sichtbare DNA-Bande mit einer Pipette abgenommen und dreimal mit 1 Vol. Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die CsCl-haltige DNA-Lösung wurde dann mit sterilem Wasser 1:3 (v/v) verdünnt und auf 0,2 M NaAc eingestellt. Durch die dosierte Zugabe von Isopropanol ließ sich ein Isopropanol/CsCl-Lösung Verhältnis von 1:1 herstellen, ohne daß das CsCl kristallisierte. Die nukleäre DNA fiel nach 4-6 Std bei 4°C aus. Sie wurde dann nach zweimaliger Waschung mit 70% Ethanol in TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

II.J.5. Qualitätskontrolle der gereinigten nukleären DNA

Jede DNA-Präparation wurde vor ihrer weiteren Verwendung einer qualitativen Prüfung unterzogen. Hierzu wurde jeweils 1 µg der DNA in einem Ansatzvolumen von 40 µl mit 1-2 U der Restriktionsendonukleasen EcoRI, BamHI und HindIII für 1 Std bei 37°C verdaut. Die Restriktionsprodukte wurden dann neben geeigneten Längenstandards (vgl. II.F.1.) auf einem 0,5%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Anzahl, die Intensität und die Lage einiger DNA-Banden, die repetitive DNA-Sequenzen enthielten, dienten für ein gegebenes Enzym als Qualitätskriterium für die präparierte DNA.

II.J.6. Partialrestriktion nukleärer DNA mit dem Restriktionsenzym Sau3A

In Hinblick auf ihre spätere Klonierung im Lambda-Vektor EMBL4 wurde die nukleäre DNA mit der Restriktionsendonuklease Sau3A partiell restringiert, um eine möglichst große Menge von DNA-Fragmenten in dem Größenordnungsbereich 10-20 kb zu erhalten. Hierzu wurden 300 µg nukleäre DNA mit 0,056 U Sau3A/µg DNA für 1 Std bei 37°C verdaut. Außerdem wurden 10 Verdauungsansätze mit je 30 µg nukleärer DNA erstellt, die mit unterschiedlichen Enzymmengen versetzt wurden (0,048 U; 0,056 U; 0,064 U; 0,072 U; 0,080 U; 0,088 U; 0,096 U; 0,104 U; 0,112 U; 0,120 U pro µg Kern-DNA). Auch diese Ansätze wurden für 1 Std bei 37°C inkubiert. Die DNA-Konzentration in den Reaktionsansätzen betrug jeweils 1 µg/20 µl. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf 30 mM EDTA und 0,2 % SDS eingestellt und dann mit 1 Vol. Phenol und 1 Vol. Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde nocheinmal mit Chloroform extrahiert und die DNA anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Die DNA-Sedimente wurden dann in Beladungspuffer aufgenommen (Endkonz.: 1 µg/µl) und Aliquote wurden zur Qualitätskontrolle über ein 0,5%-iges Agarosegel pherographiert. Die DNA der Partialrestriktionen 1-10 wurde vereinigt.

II.J.7. Fraktionierung partialrestringierter DNA im Saccharosegradienten

Die nukleäre DNA wurde über einen Saccharosegradienten mit den Eckkonzentrationen 10 und 40% Saccharose (in Gradientenpuffer) fraktioniert. Seine Erstellung erfolgte wie unter II.B.5. beschrieben. Die in Beladungspuffer aufgenommene DNA (300 µg) wurde für 10 min bei 60°C erhitzt, dann in Eiswasser abgekühlt und unverzüglich auf den Gradienten aufgetragen. Die Sedimentation der DNA-Fragmente erfolgt bei 38000 Upm und 4°C über 22 Std (Rotor SW 40; Beckman-UZ). Die Fraktionierung des DNA-Gradienten und die Rückgewinnung der DNA verlief analog der Behandlung des RNA-Gradienten (vgl. II.B.5.). Die etwaige Größe der DNA-Fragmente in den einzelnen Gradientenfraktionen wurde auf einem 0,5%-igen Agarosegel bestimmt. Die geeignete DNA-Fraktion für die Lambda-Klonierung wurde herausgesucht und ihre DNA auf 200 µg/ml eingestellt.

II.K. Klonierung in Lambda-Bakteriophagen

II.K.1. Reagenzien und Pufferlösungen

T4 DNA-Ligase : Boehringer

LB-Medium :
- Bacto-Trypton 10 g/l
- Hefe-Extrakt 5 g/l
- NaCl 10 g/l

LB-Plattenmedium :
- LB-Medium +
- Difco-Agar 15 g/l

LBM-Medium :
- LB-Medium +
- Maltose 4 g/l

LAMg-Medium :
- LB-Medium +
- Agarose 7 g/l
- $MgSO_4$ (-7 H_2O) 2 g/l

SM-Medium :
- Tris/HCl 6 g/l (pH 7,5)
- NaCl 5,8 g/l
- $MgSO_4$ (-7 H_2O) 2 g/l

Phagenpuffer :
- 100 mM Tris/HCl (pH 7,5)
- 10 mM $MgSO_4$
- 1 mM EDTA

TE-Puffer :
- 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)
- 1 mM EDTA

Ligationspuffer (5x) :
- 250 mM Tris/HCl (pH 7,4)
- 50 mM $MgCl_2$
- 50 mM Dithiothreitol (DTT)
- 5 mM Spermidin
- 5 mM ATP
- 500 µg BSA/ml

LBMg-Medium :
- LB-Medium +
- $MgSO_4$ (-7 H_2O) 2 g/l

II.K.2. Anzucht der Lambda-Bakteriophagen

II.K.2.1. Anzucht der Wirtsbakterien

Für die Klonierung nukleärer DNA in Lambda-Bakteriophagen sind verschiedene Wirtsbakterienstämme notwendig (vgl. III.F.3.4.), die unter identischen Bedingungen angezogen wurden. Wirtsbakterien, die bei -20°C in Lagermedium aufbewahrt worden waren, wurden zunächst auf LB-Platten ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden dann in 30 ml LBM-Medien überimpft und über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Die Bakterien wurden sedimentiert und in 0,1 Vol. SM-Medium suspendiert. Die Wirtsbakterien, die durch Maltose im Kulturmedium (LBM-Medium) für die Bakteriophageninfektion kompetent gemacht worden waren, mußten innerhalb von 48 Std verwendet werden.

II.K.2.2. Lambda-Stammkulturen

Stammkulturen von Lambda-Bakteriophagen wurden von einzelnen Plaques oder als Plattenlysate hergestellt. In beiden Fällen wurden bei unbekanntem Phagentiter 1, 10 und 100 µl einer Phagensuspension mit SM-Medium auf 100 µl ergänzt. Die Ansätze wurden mit je 5 µl Bakteriensuspension versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Plattierung wurden die Ansätze in je 3 ml LAMg-Medien (vortemperiert bei 45°C) überführt und die Medien dann sehr schnell auf LB-Platten transferiert und gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden bei 37°C für 12-14 Std inkubiert. Die Platte mit geeigneter Plaquedichte (die Plaques sollten möglichst dicht beieinander liegen, aber nicht miteinander verschmelzen) wurde ausgewählt, ein einzelner Plaque mit der Pasteurpipette ausgestochen und in 50 µl SM-Medium überführt. Zur Gewinnung eines Plattenlysates wurde die Platte mit 5 ml SM-Medium überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Flüssigkeitsüberstand mit den hineindiffundierten Phagen wurde dann abgenommen, mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und als Plattenlysat bei 4°C gelagert. Entsprechend wurden die Phagen aus einzelnen Plaques nachbehandelt.

II.K.3. Präparation von Lambda-DNA

II.K.3.1. Animpfung von Flüssigkulturen

Das geeignete Verhältnis von Wirtsbakterien und Phagen bestimmt entscheidend die Phagenausbeute und damit die DNA-Menge, die isoliert werden kann. Die Bestimmung von Phagentitern ist mühsam und zeitraubend. Deshalb wurde die Methode von Blattner (1977) in abgewandelter Form verwendet. Hierzu wurden 1, 10 und 100 µl eines Plattenlysates (vgl. II.K.2.2.) mit SM-Medium auf 100 µl ergänzt. Jeder Ansatz wurde mit 5 µl Bakteriensuspension versetzt, für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend in Kolben mit je 10 ml LBMg-Medium transferiert. Nach 3-4 Std im Schüttelinkubator bei 37°C sollte die Bakteriendichte ihr Maximum erreicht und nach weiteren 3-4 Std ein Minimum erreicht haben. Während der letzten 3 Std treten vermehrt Aggregate lysierter Bakterien auf. Der Testansatz, der diese Erscheinungen zeigte, galt mit seinem Bakterien/Phagen-Verhältnis als Maß für 300 ml Kulturen, die mit dem entsprechenden Vielfachen an Bakterien und Phagen angeimpft wurden. Nach der Lyse wurden die 300 ml Kulturen mit 0,5 ml Chloroform versetzt und nochmals für 10 min geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und der phagenhaltige Überstand bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

II.K.3.2. Konzentrierung und Reinigung der Phagen (Yamamoto et al., 1970)

Der Zentrifugationsüberstand (s.o.) wurde mit DNAase und RNAase (Endkonzentrationen : 1 mg/l Medium) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagen wurden anschließend mit PEG (Polyethylenglycoll) präzipitiert. Hierzu wurde die Phagensuspension durch 4 g NaCl und 10 g PEG-6000 pro 100 ml ergänzt und dann für 3-4 Std in eiskaltem Wasser inkubiert. Die Phagen/PEG-Aggregate wurden durch Zentrifugation sedimentiert (15000 x g, 5 min) und anschließend in Phagenpuffer (5 ml/100ml Lysat) vorsichtig suspendiert. Die Phagensuspension wurde unter den genannten Bedingungen nochmals zentrifugiert. Die abschließende Reinigung der Phagen erfolgte über einen CsCl-Gradienten. Für die CsCl-Reinigung wurde dann die Phagensuspen-

sion (15 ml bei 300 ml Phagenkultur) mit 19 ml CsCl-Lösung (1,5 g CsCl/ml Phagenpuffer) versetzt und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde das Gemisch mit Phagenpuffer auf 38 ml ergänzt und in ein Zentrifugenröhrchen transferiert (Endkonz.: 0,75 g CsCl/ml). Zentrifugiert wurde bei 40000 Upm und 18°C über 20 Std (Beckman-UZ; Rotor VTi 50). Die Phagenbande wurde in möglichst kleinem Volumen abgenommen (1-2 ml) und über 2 Std gegen Phagenpuffer dialysiert.

II.K.3.3. Extraktion von Lambda-DNA

Die dialysierte Phagensuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und mit SDS auf 0,5% (w/v) und EDTA auf 20 mM eingestellt. Der Ansatz wurde dann mit Proteinase K (Endkonz.: 50 µg/ml) ergänzt und für eine Stunde bei 65°C inkubiert. Zur Entfernung der Proteine wurde die DNA-Lösung zweimal mit Phenol/Chloroform und anschließend einmal mit Chloroform extrahiert. Die Lambda-DNA konnte aus der wässrigen Phase mit Isopropanol ausgefällt werden.

II.K.3.4. Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle der Lambda-DNA

Die Lambda-DNA wurde in TE-Puffer gelöst und ihre Konzentration spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt. Sie sollte etwa 1 µg/µl betragen. Die Qualitätskontrolle erfolgte auf zweierlei Weise, wenn es sich um Lambda-DNA handelte, die zur Klonierung nukleärer DNA eingesetzt werden sollte (z.B. EMBL4-DNA). Die DNA wurde zunächst auf gute Restringierbarkeit und Reinheit überprüft, indem sie mit EcoRI, BamHI oder SalI verdaut und auf einem 0,5%-igen Agarosegel pherographiert wurde (vgl. II.N.4. und II.N.5.). Die EMBL4-DNA wurde außerdem *in vitro* verpackt (vgl. II.K.4.5.) und geeignete Wirtsbakterien (z.B. Stamm DH1) wurden dann mit den Phagenpartikeln infiziert. Pro 1 µg EMBL4-DNA sollte man 5×10^8 Plaques (infizierte Bakterienzellen) erwarten.

II.K.4. Klonierung nukleärer DNA im EMBL4-Vektor

EMBL1, 2, 3 und 4 sind Lambda-Vektoren mit einem ca. 14 kb langen Mittelfragment, das im Zuge der Klonierung durch vektorfremde DNA ersetzt werden kann. Die Klonierungskapazität liegt bei 9-23 kb. Die EMBL4-Vektoren sind Derivate des Lambda-Vektors 1059 (Karn et al., 1980). Ihre Konstruktion und Verwendungsmöglichkeiten wurden durch Frischauf und Mitarbeiter (1983) beschrieben.

II.K.4.1. Präparation der EMBL4-DNA zur Klonierung

Die EMBL4-DNA wurde entsprechend II.K.3. präpariert und getestet. DNA-Präparationen, die nicht die angegebene Anzahl infizierter Bakterienzellen (etwa 5×10^8 Plaques/µg EMBL4-DNA) ergaben, wurden nicht zur Klonierung verwendet.

II.K.4.2. Restriktion der EMBL4-DNA

Die nukleäre DNA war für ihre Klonierung mit Sau3A partiell restringiert worden (vgl. II.J.6.). Dementsprechend wurde die EMBL4-DNA mit BamHI restringiert, denn beide Restriktionsenzyme erzeugen die gleichen 5'-überhängenden, einzelsträngigen Enden. Für die Vektorrestriktion wurden ca. 100 µg EMBL4-DNA in 1 ml Reaktionsansatz mit BamHI (2 U/ug DNA) für 1 Std bei $37^{o}C$ verdaut. Die Reaktion wurde bei $68^{o}C$ (für 10 min) gestoppt und ein Aliquot des Ansatzes (10 µl) auf einem 0,5%-igen Agarosegel auf Vollständigkeit der Restriktion getestet. Der Hauptansatz wurde mit Phenol und Chloroform extrahiert, die DNA mit Isopropanol präzipitiert und dann in 0,5 ml TE-Puffer aufgenommen. Der BamHI-Restriktion wurde eine SalI-Verdauung angeschlossen, bei welcher das EMBL4-Mittelfragment in kleinere Fragmente zerlegt wurde. In einem 1 ml Reaktionsansatz wurde die DNA mit SalI (4 U pro µg DNA) restringiert. Der Ansatz wurde, wie beschrieben, getestet und nachbehandelt (s.o.) und die DNA dann ebenfalls in 0,5 ml TE-Puffer gelöst.

II.K.4.3. Selektive Fällung der Vektor-Fragmente mit Isopropanol

Während der SalI-Restriktion wurde das EMBL4-Mittelfragment in 3 Subfragmente (ca. 5 kb, 8,5 kb und 0,5 kb) und 2 Oligonukleotide (je ca. 10 bp) zerlegt. Trennt man die etwa 10 bp langen Oligonukleotide von den übrigen DNA-Fragmenten, so besteht später bei der Ligation der Vektorarme mit der nukleären DNA keine Möglichkeit einer Religation der EMBL4-Fragmente zum ursprünglichen EMBL4-Vektor. Die in 0,5 ml TE-Puffer gelöste EMBL4-DNA wurde mit 0,15 Vol. einer 3 M NaAc-Lösung (pH 6,0) versetzt und in Eiswasser abgekühlt. Dem Ansatz wurden 0,6 Vol. eiskaltes Isopropanol hinzugefügt. Nach 15 min konnte die DNA abzentrifugiert werden. Unter diesen Präzipitationsbedingungen sollte das DNA-Sediment nur die drei großen Subfragmente enthalten. Die Oligonukleotide verblieben im Isopropanolüberstand. Das DNA-Sediment wurde zweimal mit 1 ml Isopropanol/NaAc-Lösung (0,6 Vol. Isopropanol + 1 Vol. 0,45 M NaAc-Lösung, pH 6,0) und einmal mit 0,5 ml Ethanol/NaAc-Lösung (2,5 Vol. Ethanol + 1 Vol. 0,3 M NaAc-Lösung, pH 6,0) gewaschen. Die so behandelte Vektor-DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen, ihre Konzentration spektralphotometrisch (bei 260 nm) bestimmt und auf 1 µg DNA pro µl eingestellt.

II.K.4.4. Ligation von nukleärer und Vektor-DNA

Für Testligationen wurde jeweils 1 µg restringierte EMBL4-DNA mit 0,2 sowie 0,4 und 0,6 µg nukleärer DNA in 5 µl ligiert. Als Kontolle für die Effizienz der selektiven Fällung mit Isopropanol (s.o.) wurde 1 µg EMBL4-DNA in gleichem Volumen ohne nukleäre DNA mit sich selbst ligiert.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
nukleäre DNA (in TE-Puffer)	0,4 µg/µl	0,5-1,5
EMBL4-DNA (in TE-Puffer)	1,0 µg/µl	1,0
Ligationspuffer	5x	1,0
Wasser	-	1,5-0,5
T4 DNA-Ligase	2 U/µl	1,0
		5,0

Die Ligationsansätze wurden für 16 Std bei 16°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 55°C erhitzt. Bis zu ihrer Weiterverarbeitung wurden die Ansätze bei -20°C eingefroren. Größere Ligationsansätze wurden als Vielfaches der Testansätze konzipiert.

II.K.4.5. Verpackung ligierter DNA im FTL/SE-Extrakt

Von allen Testligationen wurde jeweils 1 µl zur in vitro Verpackung mit den Komponenten FTL und SE (Präparation unter II.K.5.) in folgendem Ansatz gemischt :

ligierte DNA	:	1 µl
FTL (Gefrier-Tau-Extrakt, siehe II.K.5.)	:	3 µl
SE (Beschallungsextrakt, siehe II.K.5.)	:	1 µl
		5 µl

Der Verpackungsansatz wurde zunächst 10 min in Eis und dann für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit SM-Puffer auf 0,5 ml verdünnt und für seine Lagerung bei 4°C mit einigen Tropfen Chloroform versetzt.

II.K.4.6. Plattierung der Phagen

Für die Plattierung der Phagen wurden Wirtsbakterien angezogen und für die Infektion vorbereitet (vgl. II.K.2.1.). Als Wirtsbakterien wurden im allgemeinen die Stämme NM 538, NM 539 und DH1 verwendet, die sich in ihrer Infizierbarkeit durch Lambda-Phagen unterscheiden (vgl. III.F.3.4.). Mit jedem Wirtstyp wurden 1, 5 und 10 µl jedes verdünnten Verpackungsansatzes (s.o.) inkubiert und plattiert (vgl. II.K.2.2.). Nach der Inkubationszeit von 12-14 Std bei 37°C wurde die Plaquemenge auf jeder Platte bestimmt. Der direkte Vergleich der Plaquezahlen für das Wirtsbakterium NM 539 macht dann

deutlich, in welcher der Testligationen das Verhältnis von EMBL4-DNA zu nukleärer DNA besonders günstig gewählt worden war (vgl. II.K.4.4.). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden dann Großligationen mit 1-2 µg nukleärer DNA durchgeführt. Entsprechend den Ligationsansätzen wurden auch die Verpackungsansätze vergrößert. Für umfangreiche Plattierungen (z.B. zur Hybridisierung mit cDNA-Fragmenten) wurden mehrere Wirtspräparationen aus verschiedenen Einzelkolonien erstellt und durch Plattierung mit kleinen Phagenmengen auf Infizierbarkeit getestet. Die Wirtspräparation, die die meisten Plaques lieferte, wurde dann für die umfangreiche Plattierung eingesetzt. Die Plattierung der Lambda-Klonbank zur Untersuchung der rekombinanten DNA via Hybridisierung erfolgte sukzessive auf dem Bakterienstamm NM 539. Hierzu wurden jeweils 10-20 Platten (12 x 12 cm) mit je 3000-4000 Plaques erstellt. Die Platten wurden vor ihrer Weiterverwendung für etwa 1 Std unter Reinraumbedingungen getrocknet.

II.K.5. Präparation der Extrakte zur Verpackung von Lambda-DNA

Das Verpackungssystem setzt sich aus zwei Extrakten zusammen, die getrennt präpariert wurden. Hierzu wurden die beiden Bakterienstämme BHB 2690 und BHB 2688 verwendet (beide Stämme tragen lysogene Lambda-DNA). Der Extrakt aus dem Stamm BHB 2690 ist als Beschallungsextrakt präpariert worden, wohingegen der Extrakt aus dem Stamm BHB 2688 ein sogenannter Gefrier-Tau-Extrakt ist. Die Präparation der beiden Extrakte wurde exakt nach der bei Maniatis et al. (1982) beschriebenen Methode durchgeführt.

II.L. Hybridisierung von ^{32}P-markierten DNA-Fragmenten gegen rekombinante Lambda-DNA

II.L.1. Pufferlösungen

Denaturierungslösung	:	500 mM NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisationslösung	:	500 mM Tris/HCl (pH 8,0) 1,5 M NaCl
SSPE-Puffer (1x)	:	10 mM NaH_2PO_4 (pH 7,4) 180 mM NaCl 1 mM EDTA
Vorhybridisierungspuffer	:	4 x SSPE-Puffer 50 % Formamid (v/v) 0,02 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) 0,02 % Ficoll 0,02 % BSA 0,10 % SDS 50 µg Lachssperm-DNA/ml
Hybridisierungspuffer	:	gleich dem Vorhybridisierungspuffer
Waschpuffer I	:	2 x SSPE-Puffer 0,1 % SDS
Waschpuffer II	:	1 x SSPE-Puffer 0,1 % SDS
Waschpuffer III	:	0,2 x SSPE-Puffer 0,1 % SDS

II.L.2. Transfer von Plaques auf Nitrozellulose

Für den Transfer der Plaques von Agarplatten auf Nitrozellulose wurden Filter (10 x 10 cm) geschnitten, die zunächst zweimal in kochendem Wasser für jeweils 20 min erhitzt und dann autoklaviert wurden. Nach der Methode von Benton und Davis (1977) wurde ein Filter für 30 sek auf die Agarplatte gebracht, dann mit einer stumpfen Pinzette abgezogen und für 60 sek auf Whatman-Filterpapier gelegt, das mit Denaturierungslösung getränkt war (Plaques tragende Seite nach oben). Das Nitrozellulosefilter wurde anschließend in eine Neutralisationslösung transferiert und für 5 min inkubiert. Abschließend wurde das Filter noch für 10 min in 2 x SSPE-Puffer äquilibriert und dann für 2-3 Std bei 80°C gebacken. Wenn mehrere Filterabzüge von derselben Agarplatte gemacht werden sollten, so mußte das nachfolgende Filter immer 1-2 min länger auf der Platte verweilen, als das vorhergehende. Auf diese Weise konnten 6-8 Filterabzüge von derselben Agarplatte gemacht werden.

II.L.3. Homologe Hybridisierung

Für die homologe Hybridisierung wurden getrimmte cDNA-Fragmente der cDNA-Klonbank verwendet. Die cDNA-Fragmente besaßen 5'-überhängende, einzelsträngige Enden, so daß die Fragmente für die Hybridisierung terminal markiert werden konnten (vgl. II.N.8.1.). Jeweils 2 Filterabzüge jeder Agarplatte (insgesamt 30 Filter bei 15 verschiedenen Agarplatten) wurden für mindestens 6 Std in 150 ml Vorhybridisierungspuffer bei 42°C inkubiert. Zur Hybridisierung wurden die 30 Filter in 100 ml Hybridisierungspuffer transferiert. Dem Ansatz wurden dann ca. 2 µg ^{32}P-markiertes, hitzedenaturiertes cDNA-Fragment mit einer spez. Aktivität von etwa 10^7 cpm/µg DNA hinzugefügt. Der Hybridisierungsansatz wurde anschließend über Nacht bei 42°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Der Hybridisierung folgten Waschungen unter reduzierten Salzkonzentrationen und ohne Formamid bei 60°C. Die einzelnen Waschungen wurden jeweils in den Waschpuffern I-III für je 1 Std vorgenommen. Die Nitrozellulosefilter wurden dann bei Raumtemperatur getrocknet und zur Exposition mit Röntgenfilm belegt.

II.M. Methoden zur Kartierung von DNA

II.M.1. Kartierung durch partielle Restriktion

Das zu kartierende DNA-Fragment (kloniert in einem Plasmid- oder Lambda-Vektor) wurde zunächst mit seltener schneidenden Restriktionsendonukleasen, z.B. SalI, BamHI oder EcoRI, total verdaut. Dadurch konnte die Anzahl der Schnittstellen, die Anzahl der Fragmente und ihre Größe ermittelt werden. Restriktionsenzyme, die 2-4 Fragmente erzeugen, sind für die DNA-Kartierung durch partielle Restriktion besonders geeignet. Hierzu wurde die rekombinante DNA (zu kartierendes DNA-Fragment + Vektor-DNA) linearisiert und terminal radioaktiv markiert. Eines der beiden Enden wurde durch Nachrestriktion entfernt. Das einseitig markierte DNA-Fragment wurde dann partiell restringiert (hier mit EcoRI). Dem Restriktionsansatz wurden in Abständen Aliquote entnommen, die sofort für 5 min bei 68°C erhitzt wurden. Die Proben wurden dann nebst radioaktivem Längenstandard über ein Agarose- oder ein Polyacrylamidgel pherographiert und anschließend mit Röntgenfilm belegt. Sichtbar wurden dabei nur die Fragmente, die durch das Restriktionsenzym nicht von dem außen liegenden, markierten Subfragment getrennt worden waren. Die Reihenfolge der EcoRI-Subfragmente ergab sich automatisch aus den Größendifferenzen aufeinanderfolgender Partialprodukte (Smith und Birnstiel, 1976).

II.M.2. Kartierung randständiger Schnittstellen

Für diese Teilkartierung wurde das DNA-Fragment in ein- oder beidseitig, terminal ^{32}P-markierter Form verwendet. Beide DNA-Fragmente (einseitig bzw. beidseitig radioaktiv) wurden mit dem gleichen Restriktionsenzym verdaut (z.B. HinfI, DdeI, HpaII oder Sau3A) und nebeneinander über ein Polyacrylamidgel pherographiert. Dadurch ließen sich die jeweils äußeren Schnittstellen für ein gegebenes Restriktionsenzym lokalisieren. Außerdem konnte hierdurch die Orientierung dieser Schnittstellen (für verschiedene Enzyme) zueinander ermittelt werden. Eine solche Teilkartierung ist vor der Sequenzierung eines DNA-Fragmentes sinnvoll.

II.M.3. Kartierung durch Hybridisierung ("Southern Transfer")

Diese Methode wurde verwendet, um eine DNA-Sequenz mit bekanntem Informationsgehalt (z.B. eine cDNA-Sequenz) innerhalb eines größeren DNA-Fragmentes zu lokalisieren. Das DNA-Fragment wurde dazu in verschiedenen Ansätzen mit einzelnen und auch mehreren Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsprodukte wurden neben den geeigneten Längenstandards (vgl. II.F.1.) über ein Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Subfragmente wurden dann nach der Methode von Southern (1975), modifiziert nach Wahl et al.(1979), aus dem Agarosegel auf Nitrozellulose transferiert. Nach dem Transfer (2-3 Std je nach Fragmentgröße) wurde das Filter für 15 min auf Whatman-Papier gelegt, das mit 3 x SSPE-Puffer getränkt worden war (DNA-tragende Seite nach oben). Abschließend wurde das Filter für 3-4 Std bei 80°C gebacken (Southern, 1975; Thomas, 1983). Die Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA wurde unter homologen Bedingungen durchgeführt (vgl. II.L.3.).

II.N. Allgemeine Methoden

II.N.1. Reagenzien und Pufferlösungen

Restriktionsendonukleasen	:	Boehringer
DNA-Polymerase I	:	Boehringer
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	:	Boehringer
IPTG	:	BRL
X-Gal	:	BRL
Elutip-d Säulen	:	Schleicher und Schüll

Lysemedium I : 25 mM Tris/HCl (pH 8,0)
50 mM Glukose
10 mM EDTA
2 mg Lysozym/ml

Lysemedium II : 0,2 N NaOH
1 % SDS

Acetatmedium	:	3 M NaAc/HAc (pH 4,8)
RNAase-Medium	:	30 mM Tris/HCl (pH 8,6) 15 mM EDTA
TBE-Puffer	:	90 mM Tris/HCl (pH 8,3) 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
TAP-Puffer	:	40 mM Tris/HCl (pH 7,5) 20 mM NaAc 3 mM EDTA
Klenow-Puffer	:	50 mM Tris/HCl (pH 7,2) 10 mM $MgSO_4$ 0,1 mM DTT 50 µg BSA/ml
2YT-Medium	:	Bacto-Trypton 16 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl 5 g/l
2YT-Plattenmedium	:	2YT-Medium + Difco-Agar 15 g/l
Ampicillin-Lösung	:	Ampicillin 100 mg/ml (in sterilem Wasser)
IPTG-Lösung	:	IPTG 24 mg/ml (in sterilem Wasser)
X-gal-Lösung	:	X-gal 30 mg/ml (in N,N'-dimethylformamid)
Tetracyclin-Lösung	:	Tetracyclin 10 mg/ml (in sterilem Wasser)

II.N.2. Bakterienanzucht

Bakterien, die rekombinante DNA trugen, wurden unter selektiven Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von Tetracyclin (5 mg/l) oder Ampicillin (50 mg/l) in LB-Medium als 1 ml, 30 ml oder 1 l Kulturen über Nacht bei 37°C im Schüttler angezogen. Bei 1 l Kulturen wurden 10 ml Vorkulturen unter den genannten Bedingungen erstellt. Die Vorkulturen wurden entweder mit Bakterien aus Stammkulturen oder Einzelkolonien von Agarplatten angeimpft. Bakterien, die als Stammkulturen erhalten bleiben sollten (1 ml einer Vorkultur), wurden sedimentiert, in Lagermedium aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

II.N.3. Plasmidisolation

Die Plasmidisolation für analytische Zwecke wurde mit Bakterien aus 1 ml Kulturen nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Hierbei wurde das Bakteriensediment in 0,1 Vol. Lysemedium I suspendiert und in Eis inkubiert. Der Ansatz wurde nach 30 min mit 0,1 ml Lysemedium II versetzt und nach 5 min durch 0,2 ml Acetatmedium ergänzt. Nach 60 min konnte das Gemisch zentrifugiert und die extrahierte DNA mit 1 Vol. Isopropanol aus dem Oberstand präzipitiert werden. Die erhaltene DNA-Menge war für 3-4 Restriktionen ausreichend. Diese Methode wurde in erweiterter Form auch zur Isolation von Plasmid aus 1 l Bakterienkultur verwendet. Hierzu wurde die dreifache Bakterienmenge pro Volumeneinheit Lysemedium eingesetzt. Nach der Isopropanolfällung wurde das Nukleinsäuresediment (nur bei 1 l Bakterienkultur) zur weiteren Reinigung der Plasmid-DNA in 10 ml RNAase-Medium aufgenommen und mit 5 mg RNAase versetzt. Nach 60 min bei 37°C wurden 7,5 mg Proteinase K hinzugefügt und der Ansatz nochmals für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA konnte dann mit Polyethylenglycoll (PEG) und NaCl (Endkonzentrationen : 5% PEG 6000 (w/v); 0,5 M NaCl) über Nacht bei 4°C präzipitiert werden (Lis, 1980). Das Präzipitat wurde in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und das Polyethylenglycoll durch Phenolisierung entfernt. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, in TE-Puffer gelöst und dann bei 4°C gelagert.

II.N.4. DNA-Restriktion

Plasmide, die nach der oben beschriebenen Methode präpariert worden waren, konnten ohne weitere Reinigung zur enzymatischen Restriktion verwendet werden. Analytische DNA-Restriktionen wurden mit 1-3 U Restriktionsendonuklease pro 1 µg DNA bei einer DNA-Konzentration von 1 µg/40 µl Ansatzvolumen durchgeführt. Die Restriktionszeit betrug stets 1 Std, die Pufferbedingungen und die Inkubationstemperaturen entsprachen denen der Firmenangaben. Das Enzym wurde bei 68°C (5 min) inaktiviert. Präparative DNA-Restriktionen wurden mit 3 µg DNA/40 µl Ansatzvolumen durchgeführt. Die Enzymmenge wurde halbiert (pro µg DNA) und die Inkubationszeit auf 2-3 Std verlängert. Bei präparativen Ansätzen wurde das Enzym durch Phenol inaktiviert und extrahiert.

II.N.5. Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ausschließlich zu analytischen Zwecken verwendet. Hierzu wurden 5%-ige Gele mit dem Acrylamid/Bisacrylamid-Verhältnis 19:1 hergestellt. Sie besaßen ein gutes Auflösungsvermögen für DNA-Fragmente mit einer Länge von 20-600 bp. Als Elektrophoresepuffer diente TBE-Puffer.

Die Agarosegelelektrophorese wurde sowohl zur Analyse, als auch zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Je nach Verwendungszweck wurden 0,5 bis 2,5%-ige Gele erstellt. Als Elektrophoresepuffer diente TAP-Puffer mit Ethidiumbromid (0,5 mg Ethidiumbromid/l TAP-Puffer). Die Proben wurden zur Elektrophorese mit 0,1 Vol. Glyzerin/Bromphenolblau-Lösung (50% Glyzerin und 0,1% Bromphenolblau in bidestilliertem Wasser) beschwert.

II.N.6. Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarose

Die Elektroelution wurde routinemäßig zur Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarose verwendet (McDonnell et al., 1977). Das DNA-haltige Agarosestück

wurde in einen Dialyseschlauch gebracht und durch 1-2 ml 0,5 x TBE-Puffer ergänzt. Der Schlauch wurde dann an seinen Enden verschlossen und in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gelegt. Bei einer Stromstärke von 150 mA eluierte das Fragment innerhalb von 30 min. Die DNA-haltige Lösung wurde dann dem Dialyseschlauch entnommen und mit sek-Butanol unter gleichzeitiger Extraktion restlichen Ethidiumbromides auf 200 µl eingeengt (Stafford und Bieber, 1975). Die eingeengte Lösung wurde phenolisiert und die DNA mit Ethanol ausgefällt.

II.N.7. Reinigung elektroeluierter DNA-Fragmente

Die meisten Agarosen sind durch Polysaccharidsulfate verunreinigt, die nach der Elektroelution die DNA-Präparation kontaminieren. Sie sind starke Inhibitoren für viele Enzyme und mußten entfernt werden.

II.N.7.1. Elutip-d Säulen

Elutip-d Säulen (Schleicher und Schüll) besitzen die Eigenschaften von RPC-5 und RPC-5-Analoga und sind käuflich zu erwerben. Die Elutip-d Säulen wurden routinemäßig zur Reinigung von DNA-Fragmenten für die Klonierung oder Sequenzierung eingesetzt.

II.N.7.2. Sephadex-G100 Säulen

Alternativ zu Elutip-d Säulen wurden DNA-Fragmente über Sephadex-G100 chromatographiert. Das autoklavierte Säulenmaterial wurde in eine Pasteurpipette gegeben und mit 5 ml TE-Puffer gewaschen. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer auf die Säule aufgetragen und mit TE-Puffer eluiert. Die DNA wurde aus dem Eluat in üblicher Weise gefällt.

II.N.8. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

II.N.8.1 3'-terminale Markierung von DNA-Fragmenten mit (α^{32}P)-dNTP durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

Das Klenow-Fragment ist ein Degradationsprodukt der DNA-Polymerase I (Jacobsen et al., 1974) mit 5'→3' Polymerase- und 3'→5' Exonukleaseaktivitäten. Dem Klenow-Fragment fehlt die 5'→3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I. Eine effiziente Markierung der DNA-Fragmente setzt 5'-überhängende Enden voraus, die z.B. durch die Restriktionsenzyme BamHI und SalI erzeugt werden. Je nachdem, welche markierten und unmarkierten Nukleotide dem Reaktionsansatz hinzugefügt wurden, konnten die DNA-Enden einfach oder mehrfach terminal markiert werden.

Beispiel : BamHI-Markierung mit (α^{32}P)-dATP

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
DNA (in Wasser)	100-500 µg/ml	10,0
Klenow-Puffer	10 x	2,0
(α^{32}P)-dATP	10 mCi/ml	1,0
dGTP	1 mM	2,0
Wasser	-	4,0
Klenow-Fragment	1 U/µl	1,0
		20,0

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert und das Enzym anschließend bei 68°C (5 min) inaktiviert. Die freien Nukleotide wurden chromatographisch über eine Sephadex-G100 Säule entfernt (vgl. II.N.7.2.). Die Nachrestriktion des markierten DNA-Fragmentes konnte unmittelbar im Säuleneluat erfolgen.

II.N.8.2. Markierung von DNA-Fragmenten durch die DNA-Polymerase I

Die DNA-Polymerase I (Kornberg-Polymerase) besitzt neben den Aktivitäten ihres Degradationsproduktes (Klenow-Fragment) auch eine 5'→3' Exonukleaseaktivität. Das Enzym eignet sich zur internen Markierung einzelsträngig gebrochener DNA-Fragmente (Kelly et al., 1970; Maniatis et al., 1975). Die Markierung durch die DNA-Polymerase I wurde dann verwendet, wenn das DNA-Fragment besonders stark markiert werden sollte (z.B. für Hybridisierungsexperimente). In aller Regel wurde die Reaktion in Anwesenheit von (α^{32}P)-dATP und (α^{32}P)-dCTP durchgeführt.

Reaktionskomponenten	Stammkonz.	Volumina (in µl)
DNA (in Wasser)	100-500 µg/ml	10,0
Klenow-Puffer	10 x	2,0
(α^{32}P)-dATP	10 mCi/ml	2,0
(α^{32}P)-dCTP	10 mCi/ml	2,0
dGTP	1 mM	2,0
dTTP	1 mM	2,0
DNA-Polymerase I	5 U/µl	1,0
		21,0

Der Reaktionsansatz wurde für 3 Std bei 16°C inkubiert und das Enzym bei 68°C (5 min) inaktiviert. Die freien Nukleotide wurden, wie unter II.N.7.2. beschrieben, entfernt.

II.N.8.3. Klonierung in Plasmiden

Für die Umklonierung (z.B. cDNA-Sequenzen aus pBR322) oder die Subklonierung von DNA (z.B. nukleäre DNA-Fragmente aus EMBL4-DNA) wurden die Plasmide pUR222 (Rüther et al., 1981) und pUC18 (Norrander et al., 1983) verwendet. Beide Plasmide besitzen ein Ampicillin-Resistenzgen und als Selektionsmarker das Gen für die ß-Galaktosidase. Das ß-Galaktosidasegen enthält in beiden Vektoren eine multiple Klonierungssequenz, die die Insertion von DNA-

Fragmenten mit den verschiedensten Enden erlaubt. Zur Klonierung wurden Vektoren und DNA-Fragmente mit entsprechenden, verknüpfbaren Enden erstellt und ligiert.

Die Ligation wurde stets in einem Volumen von 5 µl mit insgesamt etwa 1 µg DNA (Vektor + Fragment) unter den üblichen Pufferbedingungen (vgl. II.K.4.4.) mit 1-2 U Ligase über 15 Std bei 12°C durchgeführt. Um die Insertion mehrerer DNA-Fragmente weitgehend auszuschließen, enthielt der Ligationsansatz äquimolare Mengen an Vektor und Fragment.

Zur Transformation wurde ausschließlich der Bakterienstamm RR1ΔM15 benutzt, der eine hohe Transformationsrate aufweist. Allerdings hing die Transformationsrate entscheidend von der richtigen Vorbereitung der Zellen ab. Eine Einzelkolonie des Bakterienstammes RR1ΔM15 wurde als Vorkultur in 30 ml 2YT-Medium bei 37°C über Nacht angezogen. Von dieser Vorkultur wurden 0,5 ml in 30 ml 2YT-Medium überimpft und bis zu einer OD (550 nm) von 0,2 kultiviert. Die Bakterien wurden sedimentiert und zweimal mit 20 ml 0,1 M $CaCl_2$-Lösung gewaschen. Nach der Zugabe der $CaCl_2$-Lösung wurden die Zellen für jeweils 20 min in Eis inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien in 1 ml der $CaCl_2$-Lösung aufgenommen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zur Transformation wurde der Ligationsansatz (5 µl) mit 0,1 ml der Bakteriensuspension versetzt und für 30 min in ein Eisbad gestellt. Die Transformationsrate ließ sich erheblich erhöhen, wenn der Transformationsansatz 5 mal für jeweils 30 sek bei 42°C inkubiert wurde. Zwischen den einzelnen Inkubationen wurde der Ansatz für 45 sek in ein Eisbad gestellt. Nach dem letzten Temperaturschock wurde der Transformationsansatz mit 10 Vol. 2YT-Medium (hier 1 ml) versetzt und für 1 Std bei 37°C inkubiert.

Für die Selektion rekombinanter Bakterien wurden 2YT-Platten mit 40 µg Ampicillin, 200 µg X-Gal und 160 µg IPTG jeweils pro ml verwendet. Bakterienkolonien, die durch ein Abbauprodukt des Substrates X-Gal blau gefärbt waren, enthielten intakte ß-Galaktosidasegene, wohingegen bei weißen Bakterienkolonien das ß-Galaktosidasegen durch die Insertion von Fremd-DNA zerstört worden war. Etwa 10 weiße Bakterienkolonien wurden dann aussortiert und in 1 ml Kulturen herangezogen. Ihre Plasmide wurden isoliert, die inserierte Fremd-DNA wurde enzymatisch exzisiert und gelelektrophoretisch analysiert.

III. ERGEBNISSE

III.A. Die cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Homopolymer-Methode"

Zur Synthese und Klonierung der cDNA bei Spinat wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, nämlich die "Homopolymer-Methode" und die "Linker-Methode". Die in dieser Arbeit gewählten Methodenbezeichnungen charakterisieren die Art der cDNA-Insertion in den Klonierungsvektor.

III.A.1. Die Poly(A)$^+$-RNA als Matrize der cDNA-Synthesen

Der cDNA-Synthese stand bei beiden Methoden die Isolation und Reinigung der Poly(A)$^+$-RNA voran und im Zusammenhang damit die grundlegende Frage nach der Komplexität der cDNA-Klonbank und der Menge an Poly(A)$^+$-RNA, die zur cDNA-Synthese eingesetzt werden mußte, um eine repräsentative cDNA-Klonbank zu erhalten. Untersuchungen von Kamalay und Goldberg (1980) an Tabakpflanzen, von Bishop et al. (1974) an HeLa-Zellen und Galau et al. (1976) an Seeigeln haben ergeben, daß eine typische Eukaryotenzelle zwischen 10000 und 30000 mRNA-Spezies enthält. Unter Berücksichtigung dieser Daten sollte die cDNA-Klonbank aus mindestens 10^5 Transformanden bestehen. Für die Kalkulation der notwendigen, über Säulen gereinigten RNA-Menge mußte aber noch berücksichtigt werden, daß die Poly(A)$^+$-RNA durch rRNA kontaminiert war, daß die Umschreibung der Poly(A)$^+$-RNA nicht quantitativ erfolgt, daß Verluste nach jedem Reaktionsschritt während der Synthese auftreten, und daß die Klonierung homopolymer elongierter cDNA nicht mit üblicher Effizienz möglich ist. Es gilt die Regel, daß für 10^5 Transformanden 0,5-1,0 µg GC-homopolymer elongierte cDNA zur Verfügung stehen sollten.

Für die cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Homopolymer-Methode" wurden zwei Strategien verfolgt, die sich in der Qualität der Poly(A)$^+$-RNA als Matrize der cDNA-Synthese unterscheiden. Erstens wurde eine cDNA-Klonbank aus unfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA hergestellt und zweitens wurden mehrere cDNA-Klonbanken aus größenfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA erstellt. Im 1. Fall wurden daher ca. 50 µg über Oligo(dT)-Zellulosesäulen gereinigte, intakte RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt. Mit dieser RNA-Menge war zu erwarten, daß die cDNA-

Klonbank auch Sequenzen geringer Abundanz enthielt. Für den 2. Fall wurde die über Oligo(dT)-Zellulosesäulen gereinigte RNA im Saccharosegradienten fraktioniert (Abb. 2 A). Um zu gewährleisten, daß die Poly(A)$^+$-RNA (als fraktionierte oder unfraktionierte Präparation) auch Sequenzen enthielt, nach denen die cDNA-Klonbanken später abgesucht werden sollten, wurden alle verwendeten RNA-Präparationen auf ihre Intaktheit und ihren Informationsgehalt überprüft. Dazu wurden die verschiedenen RNAs zunächst in vitro translatiert (im Kaninchen-Retikulocytenlysat) und die ^{35}S-markierten Translationsprodukte über ein PAA-Gradientengel pherographiert (vgl. Abb. 2 B). Auf diese Weise konnte die Intaktheit der RNAs sichergestellt werden. Zur Prüfung des Informationsgehaltes wurden die in vitro Translationsprodukte mit monospezifischen Antikörpern sondiert. Durch die Fraktionierung der Poly(A)$^+$-RNA wurde eine Anreicherung weniger abundanter mRNA-Spezies erreicht, womit sich die Wahrscheinlichkeit erhöhte, entsprechende cDNA-Sequenzen in den Klonbanken vorzufinden. Von jeder Poly(A)$^+$-RNA Fraktion wurde eine separate cDNA-Klonbank erstellt.

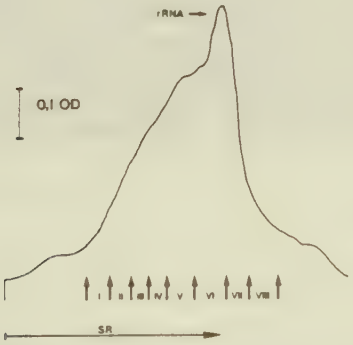


Abb. 2 A : Absorptionsprofil der im Saccharosegradienten fraktionierten Poly(A)$^+$-RNA (OD bei 260 nm)

I-VIII : Gradientenfraktionen
SR : Sedimentationsrichtung
rRNA : Kontamination der Poly(A)$^+$-RNA durch ribosomale RNA

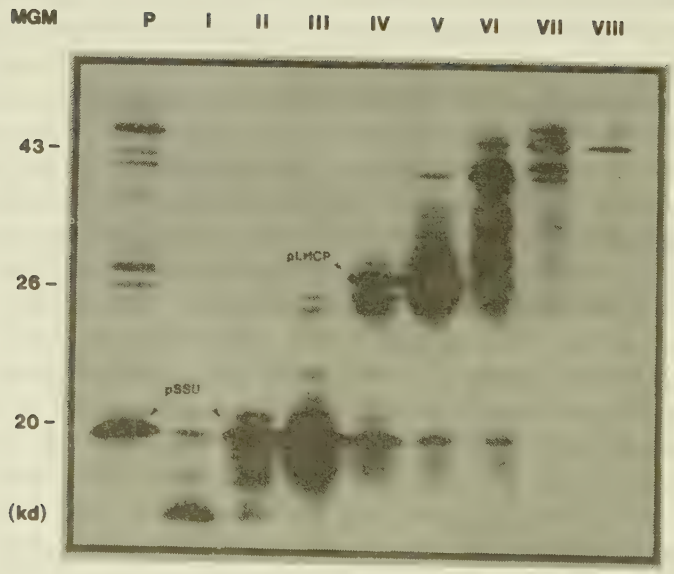


Abb. 2 B : Gelelektrophoretisch aufgetrennte Translationsprodukte der im Saccharosegradienten fraktionierten Poly(A)$^+$-RNA (Fluorographie)

I-VIII : Translationsprodukte der fraktionierten Poly(A)$^+$-RNA
P : Translationskontrolle (Poly(A)$^+$-RNA, unfraktioniert)
pSSU : Vorstufe des reifen SSU-Polypeptides
pLHCP : Vorstufe eines reifen LHC-Polypeptides
Gel : 10-15% PAA (denaturierende Bedingungen)
MGM : Molekulargewichtsmarker in kd (vgl. II.E.1.)

III.A.2. Die cDNA-Synthese ("Homopolymer-Methode") und die Qualität der cDNA-Klonbanken

Die cDNA-Synthese nach der "Homopolymer-Methode" wurde im wesentlichen nach Land et al. (1981) durchgeführt. Die einzelnen Schritte (1-10) der Synthese und Klonierung sind in Abb. 3 zusammengefaßt.

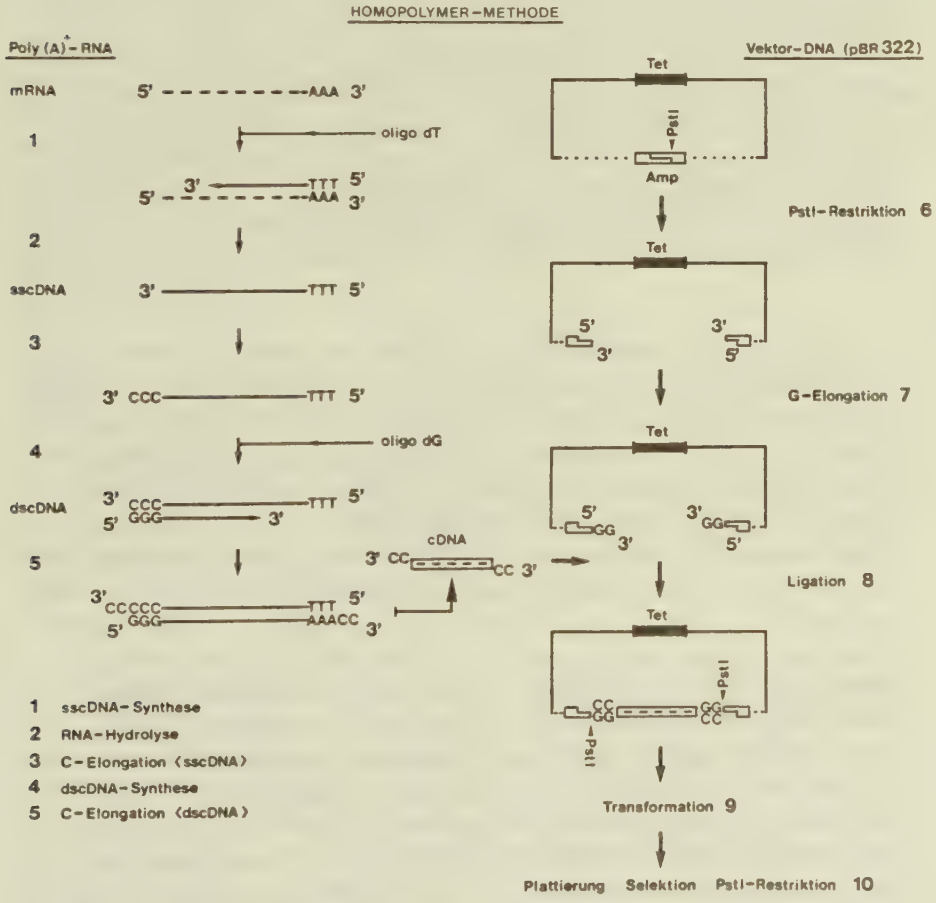


Abb. 3 : Schema zur cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Homopolymer-Methode"

1-10 : Schritte der cDNA-Synthese und Klonierung (siehe Text)

Tet, Amp : Resistenzloci im Vektor pBR322

Die cDNA-Synthese nach der "Homopolymer-Methode" wurde sowohl mit unfraktionierter, als auch fraktionierter Poly(A)$^+$-RNA durchgeführt. Die Verwendung qualitativ unterschiedlicher RNA-Präparationen machte jedoch keine Veränderungen in den einzelnen Reaktionen der Synthese notwendig. Zur cDNA-Synthese aus unfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA wurden ca. 50 µg über Oligo(dT)-Zellulose sauber gereinigte RNA verwendet. Von den einzelnen RNA-Fraktionen des Saccharosegradienten wurden Mengen zwischen 10 und 50 µg RNA eingesetzt. Hierbei mußte berücksichtigt werden, daß die einzelnen RNA-Fraktionen mit unterschiedlichen und schwer abschätzbaren Mengen an rRNA kontaminiert waren, und daß die Komplexität der mRNA-Populationen der Gradientenfraktionen sehr verschieden war. So wurden beispielsweise von Fraktion VI des Saccharosegradienten, die sehr stark durch rRNA kontaminiert und äußerst komplex hinsichtlich ihrer mRNA-Zusammensetzung war, etwa 50 µg RNA eingesetzt. Demgegenüber waren 10 µg aus Fraktion III des Saccharosegradienten für die cDNA-Synthese hinreichend. Diese Fraktion enthielt keine nennenswerte Mengen an rRNA.

Die enzymatische Umwandlung der Poly(A)$^+$-RNA in einzelsträngige cDNA (sscDNA) wird von der Reversen Transkriptase katalysiert. Dieser erste Schritt der Synthese (vgl. Abb. 3, (1)) bestimmte im wesentlichen die Gesamtausbeute an doppelsträngiger, klonierbarer cDNA (vgl. Diskussion). Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (vgl. II.C.2.) konnten aus ca. 50 µg unfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA etwa 3 µg einzelsträngige cDNA (sscDNA) synthetisiert werden. Diese Ausbeute ist ausreichend, um nach den folgenden Schritten (2-5) der Synthese etwa 2,5 µg doppelsträngige cDNA zu erhalten. Verluste an cDNA entstehen bei der RNA-Hydrolyse (2), der 3'-terminalen Elongation der sscDNA mit dCTP durch die Terminaltransferase (3), der Synthese der doppelsträngigen cDNA durch die Reverse Transkriptase (4) und der 3'-terminalen Elongation der dscDNA durch die Terminaltransferase (5) einerseits dadurch, daß die Substrate in den einzelnen Reaktionen nicht quantitativ verwertet werden, andererseits aber auch dadurch, daß die Rückgewinnung der cDNA bei Reinigungsschritten (z.B. Extraktionen mit Phenol und Chloroform oder chromatographischen Trennungen) nicht vollständig ist (zu den einzelnen Reaktionen: siehe Diskussion). Die Ausbeuten an dscDNA lagen bei der "Homopolymer-Methode", je nach eingesetzter Menge Poly(A)$^+$-RNA (10-50 µg), zwischen 0,5 und 2,5 µg. Die höchste Ausbeute lieferte die unfraktionierte Poly(A)$^+$-RNA mit 2,5 µg dscDNA

pro 50 µg RNA. Die Ausbeuten liegen im Rahmen der üblichen. Nach der Synthese der sscDNA (1) und der alkalischen Hydrolyse der mRNA-Matrize (2) wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt, um Aussagen über die Länge der sscDNA-Fragmente machen zu können. Hierzu wurde ein Aliquot der ^{32}P-markierten sscDNA unter denaturierenden Bedingungen über ein 1,5%-iges Agarosegel pherographiert (vgl. II.D.12.). Das Gel wurde dann mit Röntgenfilm belegt und exponiert. In Abb. 4 ist die Autoradiographie eines solchen Geles wiedergegeben. Hieraus geht hervor, daß sscDNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 150 bis 1800 b synthetisiert worden waren, und daß die Masse der sscDNA-Fragmente zwischen 500 und 1600 b liegt. Bei den übrigen Reaktionen der cDNA-Synthese (vgl. Abb. 3), der Synthese der dscDNA (4) und den Elongationsreaktionen (3 und 5), die in Gegenwart von ^{32}P- bzw. ^{3}H-markierten Nukleotiden ((α ^{32}P)-dATP bzw. ^{3}H-dCTP) abliefen, diente jeweils der Zuwachs an Radioaktivität als Maß für die Qualität einer Reaktion.

Zur Klonierung der dscDNA wurde der Vektor pBR322 eingesetzt, der vor seiner Verwendung zunächst mit dem Enzym PstI linearisiert (6) und anschließend an seinen 3'-Enden mit dGTP durch die Terminaltransferase verlängert wurde (7). Grundsätzlich kann zur Insertion der mit GC-Homopolymeren verlängerten dscDNA jede Restriktionsstelle (Voraussetzung sind 3'-überhängende Enden) in jedem Plasmid-Vektor verwendet werden. Jedoch nur wenige Schnittstellen (z.B. PstI-Schnittstellen) werden bei der Insertion der dscDNA regeneriert, so daß das cDNA-Fragment mit demselben Restriktionsenzym wieder exzisiert werden kann (siehe Diskussion).

Nach der Insertion der dscDNA in den Vektor pBR322 (8) folgte die Transformation mit dem Bakterienstamm DH1 (9) und die Plattierung der Transformanden auf tetracyclinhaltigen Agarplatten. Die dscDNA wurde in mehreren Portionen kloniert und die anfallenden cDNA-Klone sukzessive analysiert. Hierzu wurden die cDNA-Fragmente mit der Restriktionsendonuklease PstI exzisiert und über Agarosegele pherographiert (10). Anhand der Restriktionsergebnisse von mehreren Hundert Plasmiden ergab sich, daß ca. 80% aller Klone eine cDNA-Sequenz von 200 bis 1500 bp trugen.

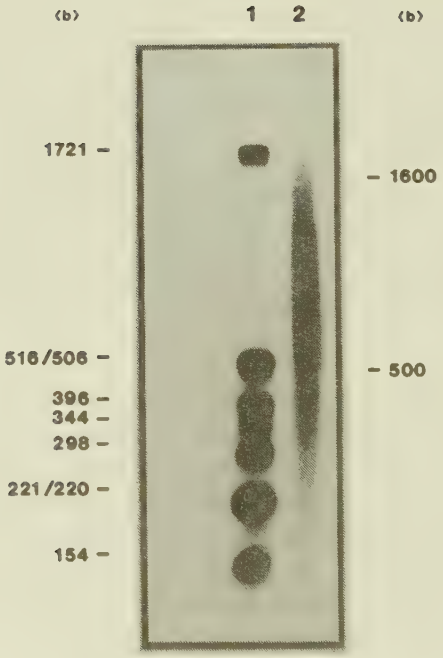


Abb. 4 : Größenbestimmung der sscDNA, synthetisiert nach der "Homopolymer-Methode" (Autoradiographie)

Die Syntheseprodukte der sscDNA-Synthese und ^{32}P-markierter Längenstandard wurden über ein 1,5%-iges Agarosegel pherographiert (denaturierende Bedingungen).

1 : Längenstandard (pBR322/HinfI verdaut)
2 : synthetisierte sscDNA

III.A.3. Strategie zur Auffindung und Isolation bestimmter cDNA-Sequenzen

Da homologe oder heterologe Hybridisierungsproben nicht verfügbar waren, die die Isolation spezifischer cDNA-Sequenzen nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) leicht gemacht hätten, mußte der beschwerliche Weg der Hybridselektion gegangen werden. Hierzu wurde die Methode von Bünemann et al. (1982) verwendet, die sich durch hohe Spezifität und ausreichende Sensibilität auszeichnet.

Die rekombinante DNA von jeweils 10 cDNA-Klonen wurde isoliert, mit DMSO denaturiert und an aktivierter Sephacrylmatrix immobilisiert (die Einzelklone wurden gesondert in 30 ml Kolben angezogen und die Bakterien von je 10 Kolben vor der DNA-Isolation vereinigt). Komplementäre mRNA-Spezies wurden dann durch Hybridisierung selektiert und nach ihrer Elution im Kaninchen-Retikulocytenlysat translatiert. Die ^{35}S-markierten Translationsprodukte wurden über ein PAA-Gradientengel pherographiert. Auf diese Weise wurden ca. 2000 cDNA-Klone untersucht. Abb. 5 gibt das Ergebnis einer solchen Analyse wieder. Die in diesem Beispiel untersuchten Klone enthielten cDNA-Sequenzen, die aus unfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA gewonnen worden waren. Einige Bahnen der Fluorographie zeigen weniger oder weniger verschiedene Signale als bei 80% rekombinanter DNA zu erwarten wären (vgl. III.A.2.). Dies deutet darauf hin, daß einige cDNA-Sequenzen möglicherweise ribosomalen Ursprungs sind oder Transkripte der gleichen mRNA-Spezies enthalten.

Ausgehend von derartigen Ergebnissen wurden solche Translationsprodukte weiterverfolgt, deren Molekulargewichte denen uns bekannten Vorstufen kernkodierter Polypeptide der Thylakoidmembran entsprachen. Es wurde anschließend durch Immunpräzipitation mit entsprechenden monospezifischen Antikörpern ermittelt, ob es sich um das gesuchte Polypeptid handelte. War die Immunpräzipitation positiv, so wurden die rekombinanten Plasmide jedes einzelnen Klones einer Klonpopulation getrennt zur Hybridselektion eingesetzt. Die Summe der resultierenden Einzelsignale entsprach stets dem Signalmuster der ursprünglichen Klonpopulation. In einigen Fällen zeigten verschiedene Klone die gleichen Signale. Das gesuchte Translationsprodukt wurde dann abermals immunologisch geprüft, wodurch der gesuchte Klon endgültig identifiziert war.

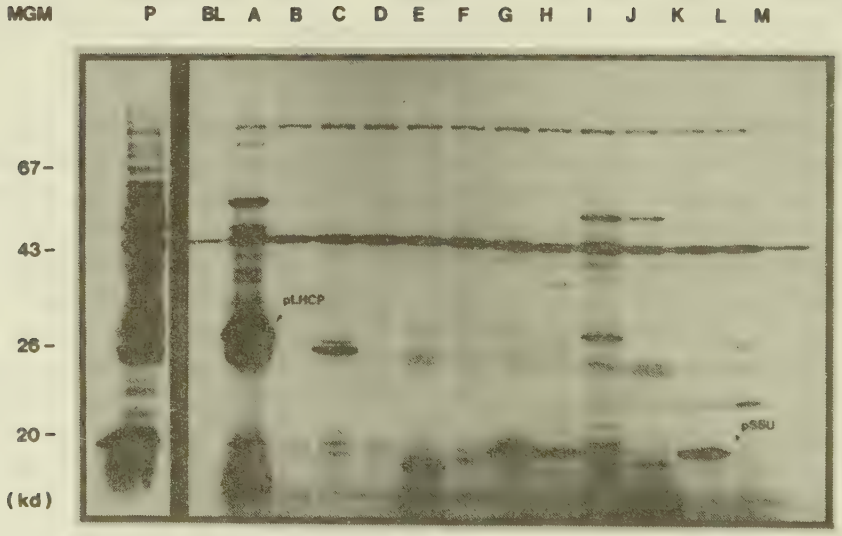


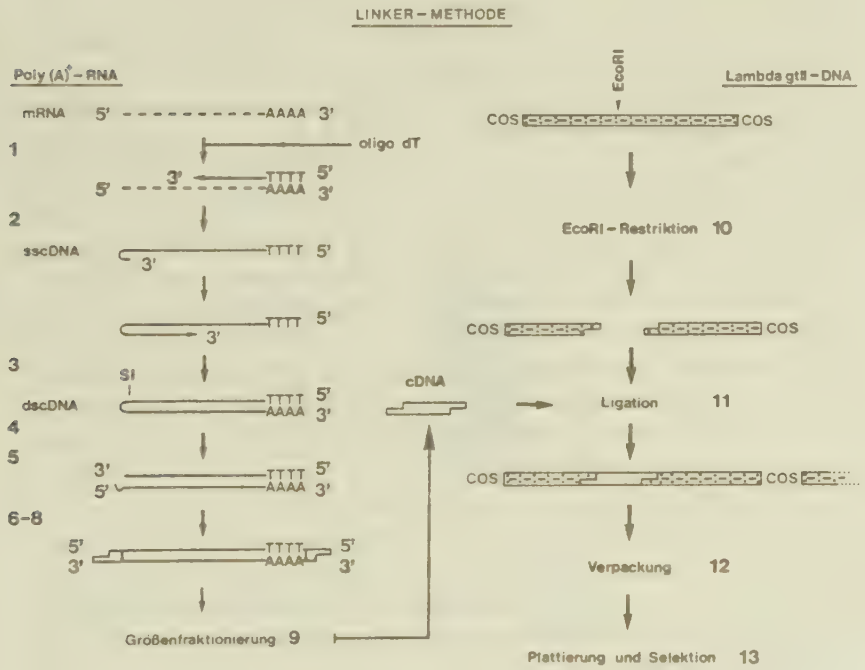
Abb. 5 : Pherographierte, ^{35}S-markierte Translationsprodukte hybridselektierter mRNA-Spezies von 12 Populationen zu je 10 cDNA-Klonen

P	:	Translationskontrolle (Poly(A)$^+$-RNA)
BL	:	Blindwert (keine exogene RNA im Translationssystem)
A-M	:	hybridselektierte mRNA-Spezies der 12 Populationen
pSSU	:	Vorstufe des reifen SSU-Polypeptides
pLHCP	:	Vorstufe des reifen LHC-Polypeptides
Gel	:	10-15% PAA (denaturierende Bedingungen)
MGM	:	Molekulargewichtsmarker in kd (vgl. II.E.1.)

(Fluorographi

III.B. Die cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Linker-Methode"

Neben der cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Homopolymer-Methode" wurde auch die "Linker-Methode" zur Erstellung einer cDNA-Klonbank von Spinat verwendet. Die einzelnen Schritte (1-13) der "Linker-Methode" sind in Abb. 6 zusammengefaßt.



1 sscDNA-Synthese
2 RNA-Hydolyse
3 dscDNA-Synthese
4 EcoRI-Methylase
5 SI-Nuklease
6 Klenow-Fragment
7 Linker-Addition (EcoRI)
8 EcoRI-Restriktion

Abb. 6 : Schema zur cDNA-Synthese und Klonierung nach der "Linker-Methode"

1-13 : Schritte der cDNA-Synthese und Klonierung (siehe Text)

Zwischen den beiden Methoden zur Synthese und Klonierung von cDNA existieren diverse Unterschiede, die zu cDNA-Klonbanken unterschiedlicher Qualität führen können (siehe Diskussion), so daß sie einander nicht ersetzen, sondern ergänzen. Während die cDNA-Synthese nach der "Homopolymer-Methode" mit fraktionierter und unfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA durchgeführt wurde, ging die Erstellung der cDNA-Klonbank nach der "Linker-Methode" zunächst ausschließlich von unfraktionierter Poly(A)$^+$-RNA aus. Dabei stammte die Poly(A)$^+$-RNA bei beiden Methoden aus derselben RNA-Präparation. Wie schon bei der "Homopolymer-Methode" ist auch hier die Synthese der sscDNA durch die Reverse Transkriptase (Abb. 6; 1) der Schritt der cDNA-Synthese, der wesentlich die Ausbeuten an doppelsträngiger, klonierbarer cDNA bestimmt (siehe Diskussion). Die Synthese der sscDNA konnte mit nur etwa 7 µg Poly(A)$^+$-RNA durchgeführt werden, da unter den gewählten Reaktionsbedingungen die Ausbeute an sscDNA mit etwa 2 µg sehr groß war. Nach der alkalischen Hydrolyse der mRNA-Matrize (2) folgte die Synthese des zweiten DNA-Stranges (dscDNA), die durch das Klenow-Fragment und die DNA-Polymerase I katalysiert wurde (3). Im Unterschied zur der dscDNA-Synthese bei der "Homopolymer-Methode" wird bei der "Linker-Methode" eine natürliche Schleifenstruktur am 3'-Ende der sscDNAs zur Initiation der dscDNA-Synthese genutzt (siehe Diskussion). Allerdings besitzen nicht alle sscDNAs eine solche Terminalstruktur, so daß nicht alle sscDNAs zur doppelsträngigen cDNA ergänzt werden. Dies bestätigte sich durch die Tatsache, daß aus ca. 2 µg sscDNA nach der dscDNA-Synthese (3), der Methylierung der dscDNA durch die EcoRI-Methylase (4) und der S_1-Nukleasebehandlung (5) "nur" etwa 1,0-1,5 µg dscDNA gewonnen werden konnten, obwohl etwa 4 µg dscDNA theoretisch zu erwarten gewesen wären. Die Mengendifferenz ist sowohl auf sehr obligatorische Verluste bei den Reinigungen der dscDNA zwischen den Reaktionen (2-5), als auch, und zwar in stärkerem Maß, auf die unvollständige Umsetzung der sscDNA in dscDNA zurückzuführen. Um schlüssige Aussagen über die Qualität der cDNAs nach den Reaktionen (1), (3) und (5) machen zu können, wurden Aliquots der jeweiligen Reaktionsprodukte unter denaturierenden Bedingungen über ein 1,5%-iges Agarosegel pherographiert (vgl. II.D.12.). Das Gel wurde dann mit Röntgenfilm belegt und exponiert. In Abb. 7 ist die Autoradiographie eines solchen Gels wiedergegeben. Die sscDNA besitzt demnach eine Länge von 100-2500 b, wobei auch hier die Masse der sscDNA zwischen 500 und 1600 b liegt (Abb. 7, B). Nach der Synthese des zweiten DNA-Stranges (die beiden DNA-Stränge sind über die terminale Schleifenstruktur miteinander verknüpft) entstehen nach der alkalischen Denaturierung einzelsträngige cDNAs mit einer Länge

von 200 bis mehr als 4000 b (vgl. Abb. 7, C). Die Mehrheit der cDNAs besitzt eine Länge von etwa 800-3500 b. Daraus folgt, daß die Synthese der dscDNA erfolgreich gewesen ist. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch nach der S_1-Nukleasebehandlung (vgl. Abb. 6, (5)), bei der die terminale Schleifenstruktur, die die beiden Stränge einer dscDNA verknüpft, geöffnet wurde. Die denaturierten dscDNAs besitzen nach der S_1-Nukleasebehandlung eine Länge von 100-2000 b (vgl. Abb. 7, B und D).

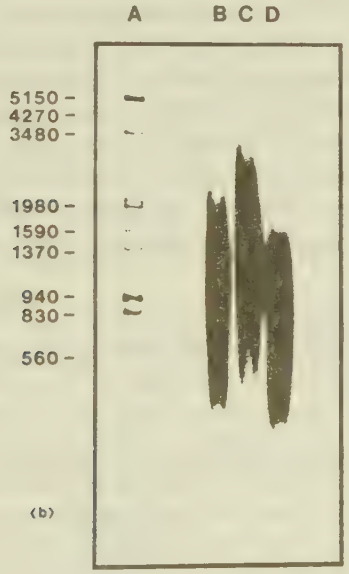


Abb. 7 : Gelelektrophoretische Analyse der Reaktionsprodukte nach verschiedenen Schritten der cDNA-Synthese ("Linker-Methode")

A : Längenstandard (Autoradiographie)
B : sscDNA nach der RNA-Hydrolyse
C : dscDNA unmittelbar nach ihrer Synthese
D : dscDNA nach der S_1-Nukleasebehandlung
Gel : 1,5%-iges Agarosegel (denaturierende Bedingungen)

Das Ziel der cDNA-Synthese nach der "Linker-Methode" war vor allem die Klonierung von "Vollängen-cDNAs", so daß nach der S_1-Behandlung (Abb. 6, (5)), dem Auffüllen der DNA-Enden durch das Klenow-Fragment (6), der Addition der EcoRI-Linker an die dscDNA durch die T4 DNA- und T4 RNA-Ligase (7) und der abschließenden EcoRI-Restriktion (8) die dscDNA größenfraktioniert werden mußte (9). Die Größenfraktionierung der dscDNA wurde chromatographisch über Sepharose 4B durchgeführt. Hierbei entstanden 3 Fraktionen, die dscDNAs der Größenordnungen 2000-700 bp, 1000-400 bp und kleiner 600 bp enthielten (die Angaben sind grobe Schätzwerte). Die Klonierung wurde mit allen fraktionierten dscDNAs durchgeführt, allerdings wurden nur die cDNA-Klone untersucht, die aus der Klonierung der ersten cDNA-Fraktion (2000-700 bp) hervorgingen (s.u.).
Die Klonierung der dscDNA wurde mit dem Lambda-Vektor gt11 durchgeführt. Er verfügt über nur eine Klonierungsstelle (EcoRI), so daß seine Verwendbarkeit begrenzt ist (siehe Diskussion). Die EcoRI-Klonierungsstelle liegt im ß-Galaktosidasegen des Vektors, so daß es als Selektionsmarker der Klonierung verwendet werden kann. Das ß-Galaktosidasegen wird vom Wirtsbakterium (Stamm Y 1088) exprimiert, so daß unter geeigneten Substrat- und Induktionsbedingungen blaue Plaques entstehen (vgl. II.D.11.). Unter gleichen Bedingungen bleiben Phagenplaques mit rekombinanter DNA ungefärbt.

Zur Klonierung der dscDNA wurde der Lambda-Vektor gt11 zunächst mit der Restriktionsendonuklease EcoRI restringiert (vgl. Abb. 6, (10)). Die beiden entstandenen Vektorfragmente (ca. 200 ng) wurden mit etwa 20 ng dscDNA ligiert (11) und in Aliquoten in vitro verpackt (12). Hierzu wurde derselbe SE/FTL-Verpackungsextrakt verwendet (präpariert nach der Methode von Maniatis et al., 1982), der auch später zur Klonierung nukleärer DNA eingesetzt wurde. Die Phagenpartikel wurden dann auf dem Wirtsbakterium Y 1088 plattiert. Hiernach konnten die Transduktionseffizienz (blaue + weiße Plaques) und die Ausbeute rekombinanter Phagen (weiße Plaques) bestimmt werden (13). Die Transduktionseffizienz betrug ca. 10^8 Plaques (weiße + blaue Plaques) pro µg ligierte DNA. Dabei betrug der Anteil rekombinanter Phagen etwa 25%, d.h. ca. $2{,}5 \times 10^7$ Plaques pro ug ligierte DNA (Vektor + dscDNA). Die hier ligierte und verpackte DNA (220 ng) lieferte etwa 5×10^6 weiße Plaques (rekombinante Phagen), so daß 2-4% dieses Verpackungsansatzes ausreichten, um eine repräsentative cDNA-Klonbank zu erstellen. Zur Qualitätskontrolle wurden stichprobenartig die Phagen einzelner Plaques in Flüssigkulturen herangezogen, ihre DNA isoliert, mit EcoRI restringiert und die Verdauungsprodukte gelelektrophoretisch analysiert. Die exzisierten cDNA-Fragmente besaßen erwartungsgemäß eine Länge von etwa 1000-2000 bp.

III.C. Identifizierung und Charakterisierung der cDNA-Fragmente von PC, LHCP, DEL, SSU und des 34kd-Polypeptides

III.C.1. Identifizierung der cDNA-Fragmente

Für die meisten plastidären, kernkodierten Polypeptide standen monospezifische Antikörper in ausreichender Menge zur Verfügung, so daß die beschriebene Prozedur zur Auffindung und Isolation bestimmter cDNA-Sequenzen mit ca. 2000 cDNA-Klonen durchgeführt werden konnte. Die verwendeten cDNA-Klone stammten alle aus cDNA-Klonbanken, die aus unfraktionierter und fraktionierter Poly(A)$^+$-RNA nach der "Homopolymer Methode" erstellt worden waren. Aus den untersuchten Klonen konnten fünf selektiert werden, die cDNA-Sequenzen für plastidäre, kernkodierte Polypeptide enthielten (Tabelle II). Beispiele für die immunologische Identifizierung sind in Abb. 8 wiedergegeben.

Tabelle II : Nomenklatur der identifizierten cDNA-Klone

p (Plasmid), So (Spinacia oleracea), c (cDNA)
PC (Plastocyanin; Abkürzung des Polypeptidnamens)

Plasmid (Klon)	Polypeptid und zugehöriger Membrankomplex
pSocPC	Plastocyanin
pSocDEL	Delta-Untereinheit der ATP-Synthase
pSoc34kd	34kd-Untereinheit des Wasserspaltungskomplexes des Photosystems II *)
pSocSSU	kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase
pSocLHCP	Chlorophyll a/b-bindendes Polypeptid des Antennenkomplexes des Photosystems II

*) Der cDNA-Klon für das 34kd-Polypeptid wurde von Th. Jansen im Rahmen seiner Diplomarbeit (1985) studiert.

Neben den 5 gezeigten, verschiedenen cDNA-Klonen wurden 15 weitere Klone selektiert, die ebenfalls für SSU, LHCP und PC kodieren. Diese zusätzlich aufgefundenen cDNA-Klone sowie die Größen ihrer PstI-exzisierbaren cDNA-Fragmente sind in Tabelle III aufgelistet. Ihre Isolation erfolgte zum Teil durch RNA-Selektion und -Translation (bei den cDNA-Klonen für SSU), zum überwiegenden Teil jedoch durch Hybridisierung mit den exzisierten cDNA-Fragmenten der zuerst isolierten Klone. Für die Hybridisierung wurden jeweils die 10 cDNA-Klone als Einzelklone auf einer Agarplatte kultiviert, die auf Grund der Hybridselektion weitere Signale gegeben hatten. Die Klone wurden nach der Methode von Grunstein und Hogness (1975) auf Nitrozellulose transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Fragmenten (für LHCP und PC) inkubiert (vgl. II.G.). Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurden die cDNA-Fragmente getrimmt, d.h. die endständigen G- und C-Polymere wurden durch Verdauung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen entfernt (vgl. II.G.1.).

Tabelle III : Nomenklatur aller identifizierten cDNA-Klone und die Größen der PstI-exzisierbaren cDNA-Fragmente

Plasmid (Klon)	Fragmentgröße	Plasmid (Klon)	Fragmentgröße
pSocLHCP	880 bp	pSocSSU	340 bp
pSocLHCP 23	650 bp	pSocSSU 19	400 bp
pSocLHCP 31	390 bp	pSocSSU 151	380 bp
pSocLHCP 463	unbekannt	pSocSSU 181	350 bp
pSocLHCP 822	470 bp	pSocSSU 444	350 bp
pSocLHCP 1002	500 bp	pSocSSU 496	420 bp
pSocLHCP 1003	350 bp		
pSocLHCP 1052	unbekannt	pSocPC	300 bp
pSocLHCP 1105	650 bp	pSocPC 85	350 bp
		pSocPC 1070	330 bp
pSocDEL	220 bp	pSoc34kd	670 bp

Die in Tabelle II und III aufgeführten cDNA-Klone stammen aus cDNA-Klonbanken, die entweder aus unfraktionierter oder fraktionierter Poly(A)$^+$-RNA nach der

"Homopolymer-Methode" erstellt worden waren. Die angegebenen Größen der cDNA-Fragmente sind als Näherungswerte zu betrachten. Das cDNA-Fragment für das 34kd-Polypeptid enthält eine zusätzliche PstI-Schnittstelle.

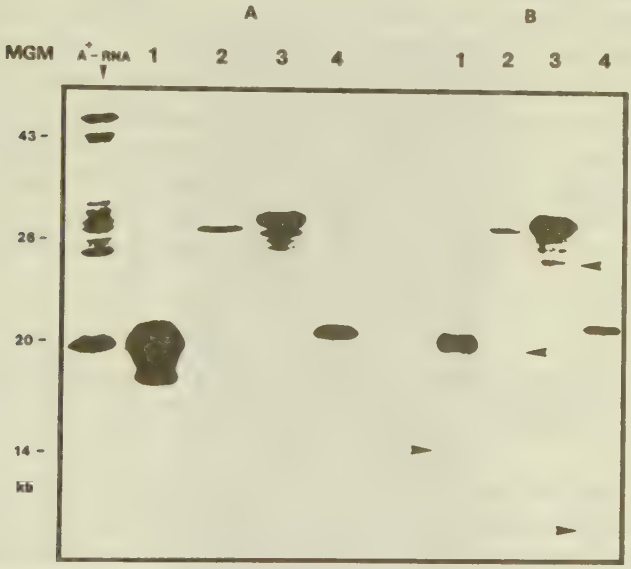


Abb. 8 : Immunologische Identifizierung verschiedener cDNA-Klone mit cDNA-Sequenzen für SSU, LHCP, PC und DEL (Fluorographie)

A : Pherographierte, ^{35}S-markierte Translationsprodukte hybridselektierter mRNA-Spezies für:
1 : pSSU (Klon pSocSSU) 2 : pDEL (Klon pSocDEL)
3 : pLHCP (Klon pSocLHCP) 4 : pPC (Klon pSocPC)

B : Immunpräzipitierte und pherographierte Translationsprodukte A1-A4 (pSSU, pLHCP, pDEL und pPC sind Polypeptidvorstufen)
(◄ : potentielle Lage der jeweiligen reifen Polypeptide)
MGM : Molekulargewichtsmarker in kd (vgl. II.E.1.)
Gel : 10-15% PAA (denaturierende Bedingungen)

III.C.2. Größenbestimmung der cDNA-Fragmente

Zur Größenbestimmung der cDNA-Fragmente wurden die entsprechenden Plasmide mit dem Restriktionsenzym PstI verdaut. Die cDNA-Fragmente lassen sich durch diese Restriktionsendonuklease komplett exzisieren, da die cDNA-Fragmente in die PstI-Schnittstelle des Vektors (pBR322) ligiert wurden und dabei beiderseits des cDNA-Fragmentes PstI-Schnittstellen regeneriert werden (siehe Diskussion). Die Produkte der PstI-Restriktion wurden dann über 2%-ige Agarosegele aufgetrennt. Abb. 9 gibt beispielhaft das Ergebnis einer solchen Größenbestimmung wieder. Die hier untersuchten cDNA-Fragmente entstammen den rekombinanten Plasmiden, die in Tabelle II aufgelistet sind (vgl. III.C.1.). In Tabelle III sind die Größen aller identifizierten cDNA-Fragmente wiedergegeben.

III.C.3. Größenbestimmung der mRNA-Spezies plastidärer, kernkodierter Polypeptide

Die identifizierten cDNA-Fragmente wurden als Hybridisierungsproben zur Bestimmung der Transkriptgrößen via "Northern Transfer" (vgl. II.H.) eingesetzt. Hierzu wurde die polyadenylierte RNA glyoxyliert, auf einem Agarosegel separiert, auf Nitrozellulose transferiert und anschließend thermisch fixiert. Die mit PstI exzisierten und getrimmten cDNA-Fragmente wurden dann radioaktiv markiert (vgl. II.N.8.1.) und hybridisiert (vgl. II.L.3.). Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abb. 10 dargestellt. Die ermittelten Transkriptgrößen sind in Tabelle IV aufgelistet. Sie sind als Näherungswerte zu betrachten.

Tabelle IV : Größen der mRNA-Spezies plastidärer, kernkodierter Polypeptide

cDNA-Sonde	Plasmid (Klon)	Polypeptid	mRNA-Größe
DEL-cDNA	pSocDEL	DEL	1050 b
PC-cDNA	pSocPC	PC	850 b
SSU-cDNA	pSocSSU	SSU	950 b
LHCP-cDNA	pSocLHCP	LHCP	1150 b

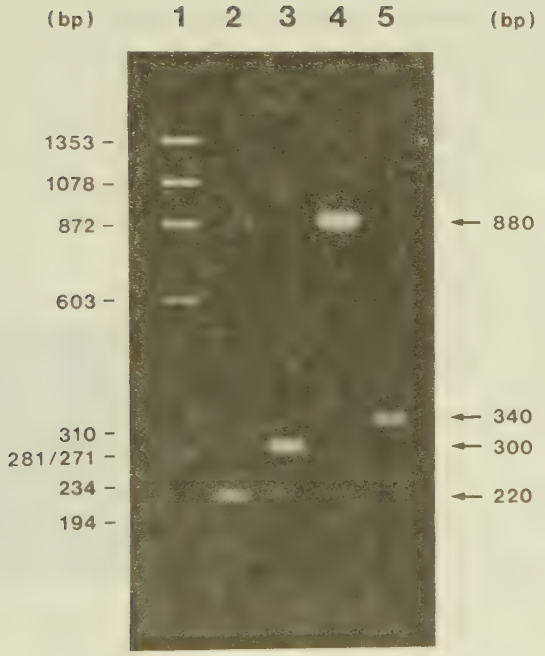


Abb. 9 : Größenbestimmung der cDNA-Fragmente für PC, LHCP, DEL und SSU

(PstI-exzisierte cDNA-Fragmente pherographiert über ein 2%-iges Agarosegel und mit Ethidiumbromid angefärbt)

1 : Längenstandard (ØX 174 mit Hae III verdaut)

2 : DEL-cDNA (Klon pSocDEL) 3 : PC-cDNA (Klon pSocPC)

4 : LHCP-cDNA (Klon pSocLHCP) 5 : SSU-cDNA (Klon pSocSSU)

Abb. 10 : Größenbestimmung der mRNA-Spezies für PC, LHCP, DEL und SSU

(Hybridisierung ^{32}P-markierter cDNA-Fragmente gegen pherographierte und auf Nitrozellulose transferierte Poly(A)$^+$-RNA; Autoradiographie)

1 : Längenstandards (Lambda/HindIII und ØX 174/HaeIII verdaut)
2 : DEL-mRNA selektiert mit DEL-cDNA (Klon pSocDEL)
3 : PC-mRNA selektiert mit PC-cDNA (Klon pSocPC)
4 : LHCP-mRNA selektiert mit LHCP-cDNA (Klon pSocLHCP)
5 : SSU-mRNA selektiert mit SSU-cDNA (Klon pSocSSU)

III.C.4. Die verschiedenen cDNA-Klone für SSU

Die Natur der fünf verschiedenen cDNA-Fragmente für SSU (vgl. Tabelle III) wurde durch Hybridisierung noch weiter untersucht. Hierzu wurden die Fragmente B (0,8 kb) und C (2,2 kb) des genomischen SSU-Klones λSonSSU (vgl. III.K.) verwendet. Durch die Sequenzierung dieser Fragmente war bekannt, daß das Fragment B die 5'-flankierende, nicht kodierende Sequenz des SSU-Genes und jene Sequenz enthielt, die für das Transitpolypeptid kodiert. Das Fragment C hingegen umfaßte die 3'-flankierende, nicht kodierende Sequenz des Gens sowie den Sequenzbereich, der für das Strukturpolypeptid kodiert.

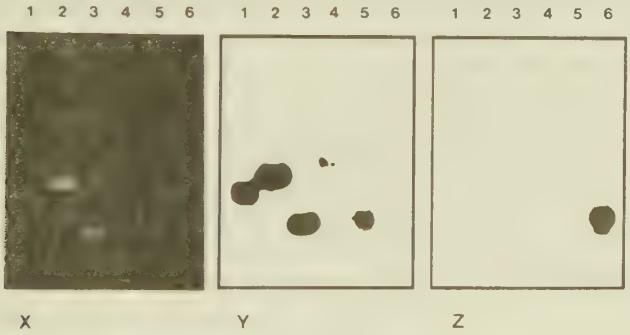


Abb. 11 : Analyse verschiedener cDNA-Fragmente für SSU

Hybridisierung ^{32}P-markierter DNA-Sequenzen für SSU gegen pherographierte und auf Nitrozellulose transferierte PstI-Restriktionsprodukte der Plasmide (Klone) : pSocSSU151 (Bahn 1), pSocSSU19 (Bahn 2), pSocSSU181 (Bahn 3), pSocSSU496 (Bahn 4), pSocSSU444 (Bahn 5) und pSocSSU (Bahn 6)

X : Pherographierte cDNAs der oben genannten Klone (1,5%-iges Agarosegel, mit Ethidiumbromid gefärbt)

Y : Hybridisierung mit dem genomischen SSU-Fragment C

Z : Hybridisierung mit dem genomischen SSU-Fragment B

(Y und Z sind Autoradiographien)

Für die Analyse wurden die verschiedenen cDNA-Fragmente für SSU aus den entsprechenden Plasmiden (vgl. Tabelle III) mit dem Enzym PstI exzisiert und anschließend über ein Agarosegel gereinigt (vgl. Abb. 11 X). Die Fragmente wurden dann auf Nitrozellulose transferiert (2 Filterabzüge) und mit den radioaktiv markierten Fragmenten C (Abb. 11 Y) bzw. B (Abb. 11 Z) hybridisiert. Aus den Hybridisierungsergebnissen geht hervor, daß die cDNA-Fragmente aller Klone, mit Ausnahme des cDNA-Fragmentes von pSocSSU (Abb. 11 X, Y, Z; Bahn 6) Sequenzen enthalten müssen, die zum 3'-Terminus der SSU-mRNA gerichtet sind.

III.D. Die Sequenzen der identifizierten cDNA-Fragmente

Da die PstI-Schnittstellen wegen der überhängenden 3'-Enden nicht bequem durch Auffüllung mit dem Klenow-Fragment markiert werden konnten, wurden die cDNA-Fragmente für die Sequenzierung in einen geeigneten Vektor umkloniert. Hierzu wurden die Fragmente aus dem Vektor pBR322 exzisiert und in die multiple Restriktionssequenz des Vektors pUR222 (Rüther et al., 1981) kloniert (vgl. II.F.2.). Dabei blieben die beiderseitigen terminalen GC-Polymere der cDNA erhalten. Die Sequenzierung (vgl. II.F.3.) wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt (vgl. physikalische Karten zu den einzelnen cDNA-Fragmenten).

III.D.1. Die cDNA-Sequenz eines Klones für Plastocyanin

Die Analyse des cDNA-Klones für Plastocyanin wurde durch die Tatsache erleichtert, daß die Aminosäuresequenz von Plastocyanin durch die Sequenzierung des Polypeptides aus Spinat (Scawen et al., 1975) determiniert worden war. Die Länge beträgt ohne die 3'-terminale Poly(A)-Verlängerung (4 x A) und ohne die beiderseitigen GC-Polymere (ca. 15 x G bzw. C) 276 bp. Mit Hilfe der Aminosäuresequenz von Plastocyanin aus Spinat konnte die Identität bestätigt und kodierende sowie nicht kodierende Abschnitte auf der cDNA festgelegt werden (vgl. Abb 12). Der Vergleich der Aminosäuresequenz von Plastocyanin nach Scawen et al. und der Aminosäuresequenz, die aus der Nukleotidsequenz der cDNA abgeleitet worden war, ergab 100% Homologie.

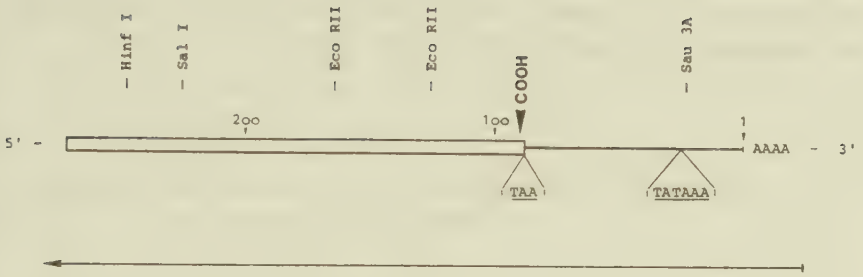


Abb. 12 : Physikalische Karte der cDNA für Plastocyanin (Klon pSocPC)

▭	:	kodierende Sequenz
——	:	nicht kodierende Sequenz
⟵	:	Sequenzierungsstrategie und -richtung
-COOH	:	C-Terminus der abgeleiteten Aminosäuresequenz
5'-	:	5'-Ende des cDNA-Fragmentes
3'-	:	3'-Ende des cDNA-Fragmentes
- SalI	:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SalI (Beispiel)
100	:	Längenangabe in Basenpaaren
⌐TAA⌐ TATAAA	:	Stoppkodon TAA und pot. Polyadenylierungssignal TATAAA
AAAA	:	3'-terminale Poly(A)-Verlängerung

Die kodierende Sequenz der cDNA für Plastocyanin ist 186 bp lang und wird von der nicht kodierenden Sequenz (90 bp) durch das Stoppkodon TAA (Ochre-Kodon) abgegrenzt. Die 186 Basenpaare kodieren für 62 Aminosäuren; das entspricht etwas mehr als 60% des reifen Polypeptides. Der nicht kodierende Bereich der cDNA enthält ein potentielles Polyadenylierungssignal der Sequenz 5'- TATAAA -3'. Es liegt 26 Nukleotide vom 3'-Terminus des cDNA-Fragmentes entfernt (vgl. Abb. 12 und 13).

Plastocyanin ist ein Polypeptid des Thylakoidlumens, d.h. es ist nicht in der Thylakoidmembran lokalisiert. Dementsprechend sind stark hydrophile Aminosäuren, wie Lysin (Lys), Asparagin (Asn), Asparaginsäure (Asp), Glutamin (Gln) und Glutaminsäure (Glu) häufig vertreten (vgl. Abb. 13).

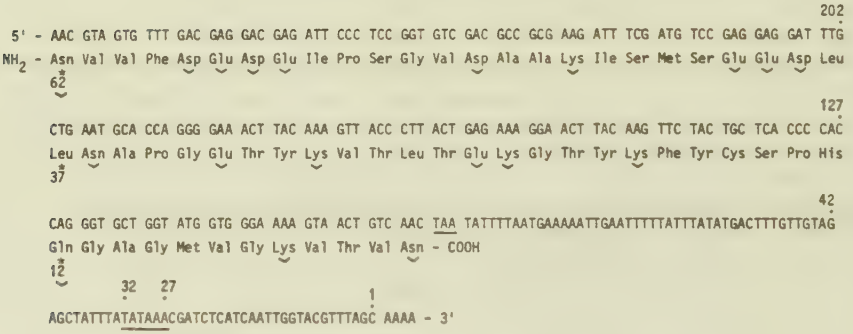


Abb. 13 : Nukleotidsequenz der cDNA für Plastocyanin (Klon pSocPC) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz für Plastocyanin

37 : Aminosäureposition
127 : Nukleotidposition
—— : Stoppkodon TAA, Polyadenylierungssignal TATAAA
⌣ : stark hydrophile Aminosäuren

(Darstellung des nicht kodierenden DNA-Stranges; er entspricht in seiner Sequenz der mRNA)

Tabelle V faßt die Kodonnutzung für Plastocyanin (Bruchstück) zusammen. Es zeigt sich, daß knapp 60% aller Kodons in der "Wobble Position" auf C oder G enden.

Tabelle V : Kodonnutzung für Plastocyanin (Bruchstück), abgeleitet aus der cDNA-Sequenz des Klons pSocPC

	T		C		A		G		
T	Phe	1	Ser	-	Tyr	-	Cys	-	T
	Phe	1	Ser	2	Tyr	3	Cys	1	C
	Leu	-	Ser	1	Stopp	1	Stopp	-	A
	Leu	1	Ser	1	Stopp	-	Trp	-	G
C	Leu	1	Pro	-	His	-	Arg	-	T
	Leu	-	Pro	2	His	1	Arg	-	C
	Leu	-	Pro	1	Gln	-	Arg	-	A
	Leu	1	Pro	-	Gln	1	Arp	-	G
A	Ile	2	Thr	4	Asn	1	Ser	-	T
	Ile	-	Thr	1	Asn	2	Ser	-	C
	Ile	-	Thr	-	Lys	3	Arg	-	A
	Met	2	Thr	-	Lys	2	Arg	-	G
G	Val	1	Ala	1	Asp	1	Gly	3	T
	Val	2	Ala	1	Asp	3	Gly	-	C
	Val	2	Ala	1	Glu	1	Gly	2	A
	Val	2	Ala	1	Glu	5	Gly	1	G

III.D.2. Die cDNA-Sequenz eines Klones für die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase

Die Aminosäuresequenz der Delta-Untereinheit der ATP-Synthase ist bei Eukaryoten gänzlich unbekannt. Zwar sind die Aminosäuresequenzen der acht Untereinheiten des ATP-Synthasekomplexes von E.coli bekannt (Gay und Walker, 1981; Nielson et al., 1981), aber die Kürze der verfügbaren cDNA-Sequenz von Spinat macht Untersuchungen zur Homologie unmöglich. Die physikalische Karte des cDNA-Fragmentes für die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase ist in Abb. 14 wiedergegeben.

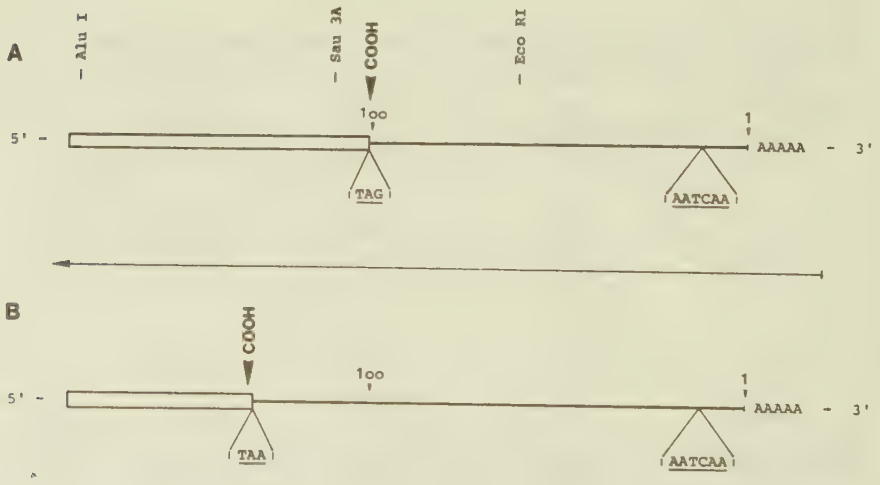


Abb. 14 : Physikalische Karte der cDNA für die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase (Klon pSocDEL)

A und B geben die möglichen Organisationsformen der DEL-mRNA wieder
Abkürzungen und Zeichen : entsprechend Abb. 12
Sequenzen : siehe Text

Die cDNA-Sequenz der Delta-Untereinheit von Spinat ist ohne die A-, C- und G-Polymere 179 bp lang. Der 3'-Bereich des cDNA-Fragmentes ist sehr reich an A und T (mehr als 75%), wohingegen die 5'-Region der cDNA nur noch ca. 60% A und T aufweist. Die cDNA-Sequenz enthält zwei mögliche Leseraster, die zum 5'-Terminus durch das Ende des Fragmentes begrenzt sind und zum AT-haltigen 3'-Bereich durch Amber- und Ochre-Stoppkodons (TAG bzw. TAA) abgebrochen werden (vgl. Abb. 14 und 15). Das potentielle Polyadenylierungssignal 5'- AATCAA -3' liegt hier 13 Nukleotide vom 3'-Ende entfernt (vgl. Abb. 15).

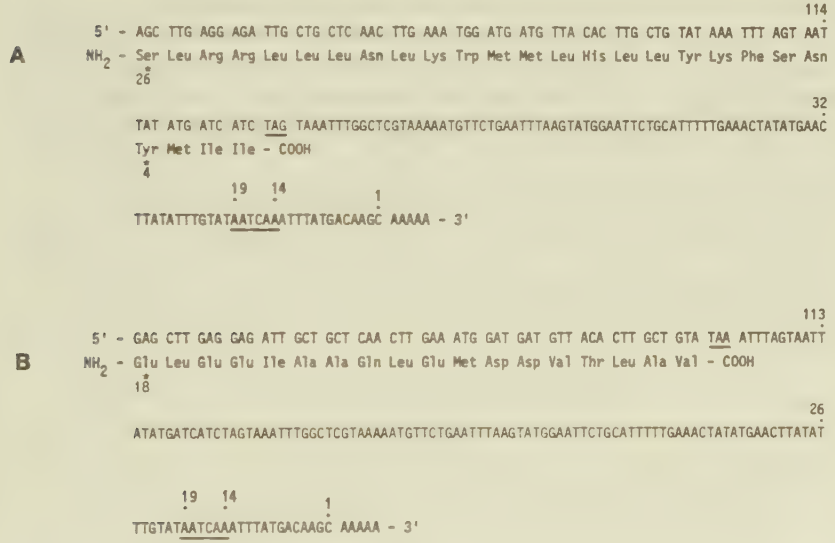


Abb. 15 : Nukleotidsequenz der cDNA für die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase (Klon pSocDEL) mit den möglichen, korrespondierenden Aminosäuresequenzen A und B

26* : Aminosäureposition
114 : Nukleotidposition
___ : Stoppkodon TAG, Polyadenylierungssignal AATCAA (zu A)
Stoppkodon TAA, Polyadenylierungssignal AATCAA (zu B)

(Darstellung des nicht kodierenden DNA-Stranges)

III.D.3. Die cDNA-Sequenz eines Klons für ein Chlorophyll a/b-bindendes Polypeptid des Photosystems II

Die Aminosäuresequenz eines Chlorophyll a/b-bindenden Polypeptides einer höheren Pflanze ist erst durch die Arbeit von Coruzzi et al. (1983) an Erbse bekannt geworden. Die Sequenz des reifen Polypeptides wurde aus einer cDNA-Sequenz abgeleitet. Das zugehörige nukleäre Gen von Erbse wurde von Cashmore (1984) isoliert und charakterisiert.

Die einleitend skizzierten Ergebnisse von Coruzzi et al. (1983) und Cashmore (1984) wurden zum Vergleich der cDNA für eines der Chlorophyll a/b-bindenden Polypeptide (LHCP) von Spinat herangezogen. Das untersuchte cDNA-Fragment des LHC-Polypeptides von Spinat ist ohne die endständigen A-, C- und G-Polymere 781 bp lang. Die Größendifferenz zur früher ermittelten Länge von 880 bp für dieses cDNA-Fragment des Klons pSocLHCP (vgl. III.C.2.) erklärt sich durch die langen A- und C-Polymere (je etwa 50 bp) am 3'-Terminus. Der nicht kodierende Abschnitt der cDNA besteht aus 121 bp mit einem potentiellen Polyadenylierungssignal 5'- AATATA -3'. Es liegt 23 Nukleotide vom 3'-Terminus entfernt (vgl. Abb. 16 und 17).

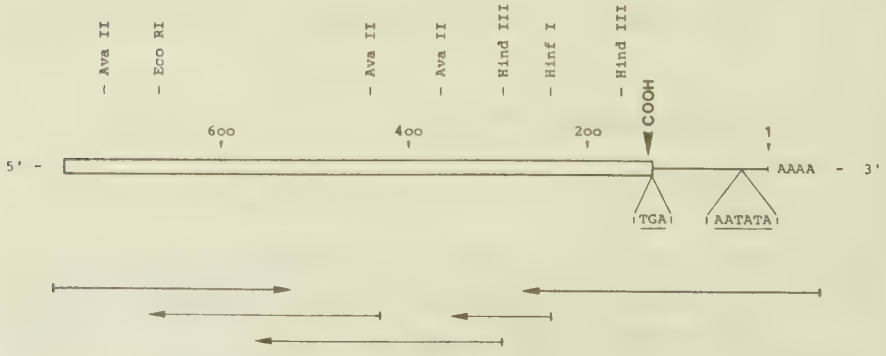


Abb. 16 : Physikalische Karte der cDNA für das LHC-Polypeptid (Klon pSocLHCP)

Abkürzungen und Zeichen : entsprechend Abb. 12
Sequenzen : siehe Text

```
                                                                                                        707
5' - AGC AGC CCA TGG TAC GGC CCA GCC CGT GTT AAA TAC TTG GGT CCA TTC TCT GGT GAA GCC CCT TCT TAC CTC GCT
NH2 - Ser Ser Pro Trp Tyr Gly Pro Ala Arg Val Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Gly Glu Ala Pro Ser Tyr Leu Ala
      220*

                                                                                                   632
      GGT GAA TTC CCC GGT GAC TAT GGT TGG GAC TCT GCT GGT CTT TCC GCT GAC CCT GAG ACT TTT TCT AAG AAC CGT
      Gly Glu Phe Pro Gly Asp Tyr Gly Trp Asp Ser Ala Gly Leu Ser Ala Asp Pro Glu Thr Phe Ser Lys Asn Arg
      195*

                                                                                                   557
      GAG CTT GAG GTG TTC CAC TCC CGA TGG GCC ATG TTG GGT GCT TTG GGT TGT GTT TTC CCA GAA CTC TTG GCC CGT
      Glu Leu Glu Val Phe His Ser Arg Trp Ala Met Leu Gly Ala Leu Gly Cys Val Phe Pro Glu Leu Leu Ala Arg
      170*

                                                                                                   482
      AAC GGT GTT AAG TTC GGT GAG GCT GTA TGG TTC AAG GCC GGT TCA CAA ATC TTT AGC GAG GGC GGG CTT GAC TAC
      Asn Gly Val Lys Phe Gly Glu Ala Val Trp Phe Lys Ala Gly Ser Gln Ile Phe Ser Glu Gly Gly Leu Asp Tyr
      145*

                                                                                                   407
      TTG GGT AAC CCA AGT TTG GTC CAT GCT CAA AGT ATC CTT GCT ATA TGG GCT TGC CAA GTT ATC TTG ATG GGT GCC
      Leu Gly Asn Pro Ser Leu Val His Ala Gln Ser Ile Leu Ala Ile Trp Ala Cys Gln Val Ile Leu Met Gly Ala
      120*

                                                                                                   342
      GTT GAG GGT TAT CGT ATT GCC GGT GGA CCT CTC GGT GAG GTG GTG GAC CCA CTT TAC CCC GGA GGT AGC TTT GAC
      Val Glu Gly Tyr Arg Ile Ala Gly Gly Pro Leu Gly Glu Val Val Asp Pro Leu Tyr Pro Gly Gly Ser Phe Asp
      95*

                                                                                                   256
      CCA TTG GGC TTG GCT GAT GAC CCT GAA GCT TTC GCT GAG TTG AAG GTC AAG GAG ATC AAG AAT GGT AGA TTG GCA
      Pro Leu Gly Leu Ala Asp Asp Pro Glu Ala Phe Ala Glu Leu Lys Val Lys Glu Ile Lys Asn Gly Arg Leu Ala
      70*

                                                                                                   183
      ATG TTT TCA ATG TTC GGA TTC TTT GTT CAA GCT ATT GTT ACA GGT AAG GGC CCN TTA GGA GAC CTA GCC GAC CAT
      Met Phe Ser Met Phe Gly Phe Phe Val Gln Ala Ile Val Thr Gly Lys Gly Pro Leu Gly Asp Leu Ala Asp His
      45*

                                                                                                   104
      CTT GCC GAC CCA GTT AAC AAC AAC GCT TGG TCT TTT GCC ACT AAC TTT GTT CCT AGC AAG TGA AGTGCCTCTTAGACT
      Leu Ala Asp Pro Val Asn Asn Asn Ala Trp Ser Phe Ala Thr Asn Phe Val Pro Ser Lys  -  COOH
      20*

                                                                                   29   24            6
      TTTAGGGAAGATTGGGAAATTGTATAACCTATTCAAGTTGTTGATGTTCTTTAATGTAAATTGGTGCAATGGATGAATATAACTAGTTTATGTGTACTA

        1
      ATGTG AAAAAAAAAAAA - 3'
```

Abb. 17 : Nukleotidsequenz der cDNA für das LHC-Polypeptid (Klon pSocLHCP) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz für LHCP

20* : Aminosäureposition

104 : Nukleotidposition

____ : Stoppkodon TGA, Polyadenylierungssignal AATATA

(Darstellung des nicht kodierenden DNA-Stranges)

Der kodierende Sequenzbereich der cDNA von Spinat enthält 660 bp und ist zur nicht kodierenden Region durch das Stoppkodon TGA (Opal-Kodon) abgegrenzt. Die 660 bp kodieren für 220 Aminosäuren (vgl. Abb. 17). Die kodierende Sequenz des nukleären LHCP-Genes von Erbse (Cashmore, 1984) besteht aus 804 bp, d.h. sie enthält Kodons für 268 Aminosäuren. Das Transitpolypeptid besteht aus 36-37 Aminosäuren, das Strukturpolypeptid setzt sich aus 232-233 Aminosäuren zusammen. Es ist nicht genau bekannt zwischen welchen Aminosäuren die Vorstufe des Polypeptides prozessiert wird, wodurch sich die verschiedenen Längenangaben für das Transit- und das Strukturpolypeptid erklären. Da die Polypeptide aus Spinat und Erbse etwa gleich groß sind, kodiert die LHCP-cDNA von Spinat demzufolge für ca. 94% der Aminosäuresequenz des LHC-Strukturpolypeptides. In Tabelle VI ist die Kodonnutzung für das LHC-Polypeptid von Spinat (Bruchstück) zusammengefaßt. Hieraus geht hervor, daß in der dritten, nicht konservierten Position der Kodons zu knapp 60% G und C vertreten sind.

Tabelle VI : Kodonnutzung für das LHC-Polypeptid (Bruchstück), abgeleitet aus der cDNA-Sequenz des Klons pSocLHCP

	T		C		A		G		
T	Phe	6	Ser	2	Tyr	1	Cys	-	T
	Phe	9	Ser	4	Tyr	3	Cys	-	C
	Leu	2	Ser	3	Stopp	-	Stopp	1	A
	Leu	8	Ser	4	Stopp	-	Trp	1	G
C	Leu	5	Pro	5	His	1	Arg	3	T
	Leu	2	Pro	1	His	-	Arg	-	C
	Leu	2	Pro	3	Gln	2	Arg	1	A
	Leu	-	Pro	4	Gln	4	Arg	-	G
A	Ile	2	Thr	2	Asn	2	Ser	5	T
	Ile	5	Thr	8	Asn	7	Ser	1	C
	Ile	-	Thr	2	Lys	2	Arg	2	A
	Met	3	Thr	2	Lys	12	Arg	-	G
G	Val	9	Ala	8	Asp	2	Gly	8	T
	Val	8	Ala	4	Asp	13	Gly	4	C
	Val	-	Ala	3	Glu	4	Gly	6	A
	Val	-	Ala	1	Glu	12	Gly	6	G

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der LHC-Polypeptide von Erbse und Spinat zeigt nur wenige Unterschiede (vgl. Abb. 18). In 12 von 220 Positionen enthält die Sequenz von Spinat andere Aminosäuren als die Sequenz von Erbse. Hieraus ergibt sich eine Homologie von etwa 95% und damit kann die Sequenz als sehr konserviert angesehen werden. Die insgesamt 12 ausgewechselten Aminosäuren sind relativ gleichmäßig über das gesamte Polypeptid verteilt. Die meisten von ihnen sind jeweils vergleichbar hydrophil, hydrophob oder indifferent. Beispielsweise besitzen Asparagin (Asn) und Asparaginsäure (Asp) einen hydrophilen, Leucin (Leu) und Isoleucin (Ile) einen hydrophoben Charakter. Die Aminosäuren Glycin (Gly) und Serin (Ser) sind nur schwach polar und können als indifferent bezeichnet werden. Daraus folgt, daß es sich bei den Austauschen zwischen dem LHC-Polypeptid von Erbse und Spinat um konservative Austausche handelt. Eine Ausnahme bildet der Austausch der hydrophoben Aminosäure Alanin (Ala) mit der hydrophilen Asparaginsäure in der Position 186 der Aminosäuresequenz (vgl. Abb. 18).

Das Chlorophyll a/b-bindende Polypeptid ist in der Thylakoidmembran lokalisiert und sollte als solches einen vornehmlich hydrophoben Charakter besitzen. Um das zu überprüfen, wurde ein Hydropathieprofil des Polypeptides nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) erstellt. Die Abb. 19 gibt die Hydropathieprofile der LHC-Polypeptide von Erbse (Abb. 19 A) und Spinat (Abb. 19 B) wieder. Hieraus geht zunächst hervor, daß die Profile weitgehend gleich sind und die ausgetauschten Aminosäuren den Charakter der Primärstruktur des Polypeptides nicht verändern. Außerdem verdeutlicht sich in den gezeigten Profilen der überwiegend hydrophobe Charakter des LHC-Polypeptides im mittleren und C-terminalen Sequenzbereich (Profilabschnitte I, II und III). Der Profilverlauf in den Abschnitten I, II und III läßt vermuten, daß diese Sequenzbereiche des LHC-Polypeptides als Transmembransegmente die Thylakoidmembran vertikal durchziehen (siehe Diskussion). Der N-terminale Abschnitt des Polypeptides ist hingegen eher als hydrophil zu bezeichnen. Dieser Sequenzbereich ist auf der cDNA von Spinat nur unvollständig erhalten.

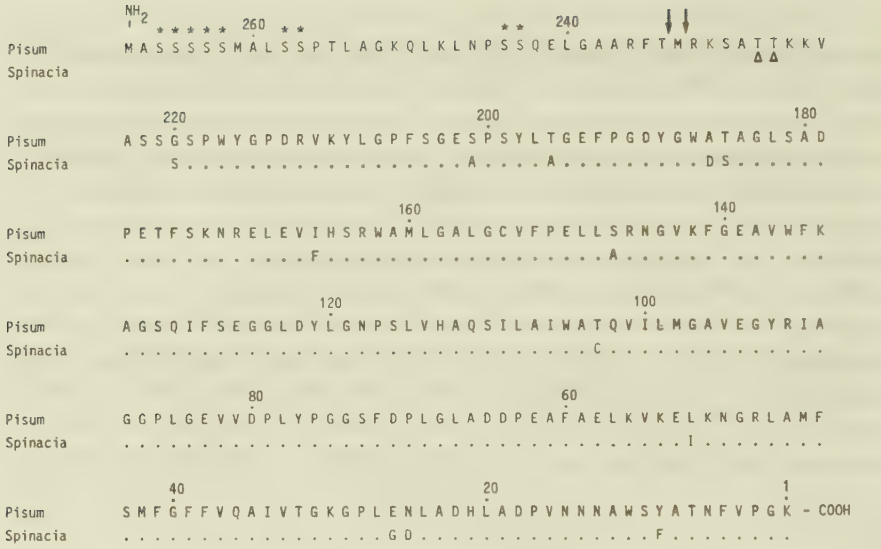


Abb. 18 : Vergleich der Aminosäuresequenzen der LHC-Polypeptide von Pisum und Spinacia (Bruchstück)

Pisum : nach Cashmore (1984) mit Transitsequenz (AS 232-268)

Spinacia : abgeleitet aus der cDNA-Sequenz des Klons pSocLHCP

(Aminosäuresequenz ist im gebräuchlichen "Einbuchstabenkode" wiedergegeben)

120 : Aminosäureposition

..... : Aminosäuren der Sequenz von Spinat, die mit der von Erbse übereinstimmen

NH_2- : N-Terminus des Polypeptides

-COOH : C-Terminus des Polypeptides

* : Serinreste der Transitsequenz des LHC-Polypeptides Pisum

↓ : pot. Spaltstellen der LHC-Polypeptidvorstufe

Δ : Threoninreste im N-terminalen Bereich des LHC-Strukturpolypeptides von Pisum (siehe Diskussion)

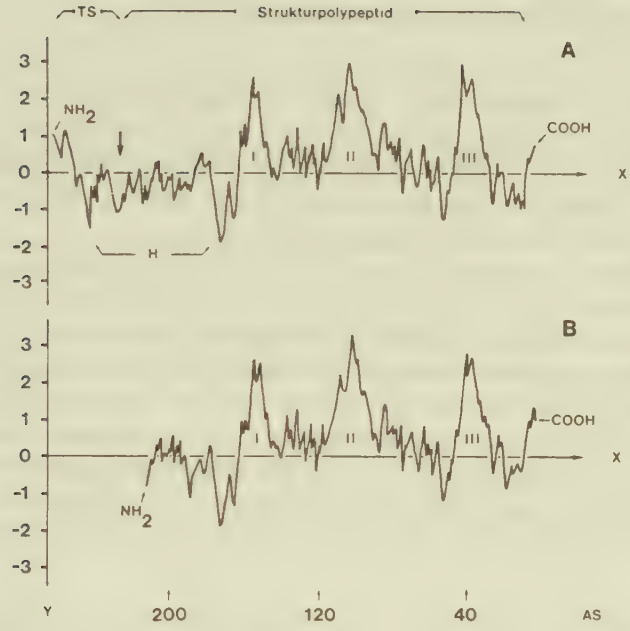


Abb. 19 : Hydropathieprofile der LHC-Polypeptide von Pisum (A) und Spinacia (B) (Bruchstück)

Y-Achse	:	Hydropathieindex (Glättungsfaktor 11)
X-Achse	:	"Aminosäureposition" (AS)
NH_2-	:	N-Terminus des Polypeptides
-COOH	:	C-Terminus des Polypeptides
I-III	:	hydrophobe Segmente des Polypeptides
__H__/	:	hydrophiles Segment des Polypeptides
↓	:	pot. Spaltstelle der LHC-Polypeptidvorstufe von Pisum (Das Profil des Polypeptides enthält auch die Transitsequenz TS)

III.D.4. Die cDNA-Sequenz eines Klones für das 34kd-Polypeptid des Wasserspaltungskomplexes des Photosystems II

Im Rahmen der Diplomarbeit von Th. Jansen (1985) gelang aus der von mir erstellten cDNA-Klonbank die Isolation und Charakterisierung einer cDNA für das 34 kd große, sogenannte "lysinreiche" Polypeptid des Wasserspaltungskomplexes des Photosystems II. Diese Daten, an deren Erstellung ich beteiligt war, sind hier der Vollständigkeit halber ebenfalls aufgeführt.

Das cDNA-Fragment für das 34kd-Polypeptid ist 609 bp lang (ohne die A-, C- und G-Polymere). Die Poly(A)-Elongation am 3'-Ende des Fragmentes umfaßt 16 Nukleotide. Die nicht kodierende Sequenz besitzt eine Länge von 99 bp und enthält ein potentielles Polyadenylierungssignal der Sequenz 5'- TATAAA -3'. Es liegt 7 Nukleotide vom 3'-Terminus entfernt (vgl. Abb. 20 und 21). Der kodierende Bereich der cDNA beinhaltet 510 bp, die für 170 Aminosäuren kodieren. Diese Sequenz ist zum nicht kodierenden Abschnitt durch das Ochre-Kodon TAA abgegrenzt.

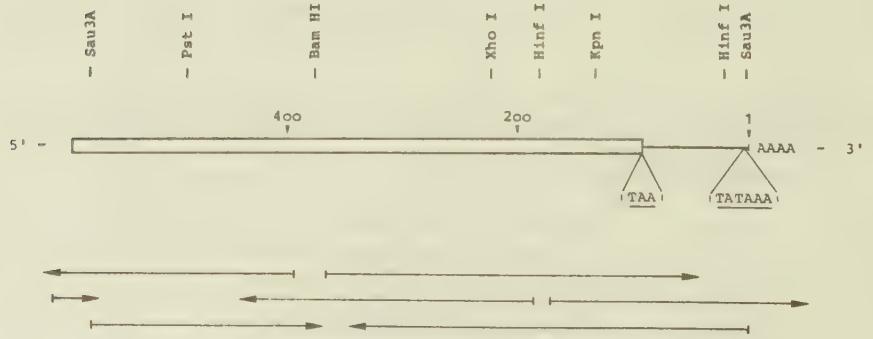


Abb. 20 : Physikalische Karte der cDNA für das 34kd-Polypeptid (Klon pSoc34kd)

Abkürzungen und Zeichen : entsprechend Abb. 12

Sequenzen : siehe Text

```
                                                                                                     535
5' - ATG ACC CGT TTA ACC TAC ACC CTC GAC GAG ATC GAG GGA CCC TTT GAG GTC TCG TCC GAT GGC ACG GTC AAG TTT
NH2 - Met Thr Arg Leu Thr Tyr Thr Leu Asp Glu Ile Glu Gly Pro Phe Glu Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Lys Phe
      170

                                                                                                     460
      GAG GAG AAA GAC GGT ATT GAC TAC GCT GCA GTC ACG GTC CAG CTC CCT GGT GGG GAG CGT GTC CCG TTC TTG TTC
      Glu Glu Lys Asp Gly Ile Asp Tyr Ala Ala Val Thr Val Gln Leu Pro Gly Gly Glu Arg Val Pro Phe Leu Phe
      145

                                                                                                     385
      ACC ATC AAG CAA CTT GTT GCA TCA GGG AAA CCT GAG AGT TTC AGT GGT GAC TTC CTA GTC CCG TCT TAC CGT GGA
      Thr Ile Lys Gln Leu Val Ala Ser Gly Lys Pro Glu Ser Phe Ser Gly Asp Phe Leu Val Pro Ser Tyr Arg Gly
      120

                                                                                                     310
      TCC TCG TTC CTT GAC CCA AAG GGC CGA GGT GGG TCC ACC GGG TAT GAC AAC GCT GTT GCG TTG CCT GCC GGT GGG
      Ser Ser Phe Leu Asp Pro Lys Gly Arg Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Asp Asn Ala Val Ala Leu Pro Ala Gly Gly
      95

                                                                                                     235
      AGA GGA GAC GAG GAG GAA CTT CAG AAG GAA AAC AAC AAG AAT GTT GCT TCC TCA AAG GGG ACA ATC ACC TTG AGT
      Arg Gly Asp Glu Glu Glu Leu Gln Lys Glu Asn Asn Lys Asn Val Ala Ser Ser Lys Gly Thr Ile Thr Leu Ser
      70

                                                                                                     160
      GTC ACC TCG AGT AAG CCG GAA ACC GGT GAG GTT ATC GGA GTT TTC CAG AGT CTT CAG CCG TCG GAC ACT GAC TTG
      Val Thr Ser Ser Lys Pro Glu Thr Gly Glu Val Ile Gly Val Phe Gln Ser Leu Gln Pro Ser Asp Thr Asp Leu
      45

                                                                                                     [illegible]
      GGT GCT AAG GTA CCC AAA GAT GTG AAG ATT GAG GGT GTT TGG TAT GCA CAA CTT GAG CAA TAA AAGGGTAAAATTTCT
      Gly Ala Lys Val Pro Lys Asp Val Lys Ile Glu Gly Val Trp Tyr Ala Gln Leu Glu Gln  -  COOH
      20
                                                                                 13   8       1
      GTATGAATGTACTGATTTTTCAGCTCTTTTTGTTGTAAGGATTTCTTGAGACTCTTTAAGGAGGAACTTATAAATGATCAT AAAAAAAAAAAA.- 3'
```

Abb. 21 : Nukleotidsequenz der cDNA für das 34kd-Polypeptid (Klon pSoc34kd) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz für das 34kd-Polypeptid

45 : Aminosäureposition

160 : Nukleotidposition

___ : Stoppkodon TAA, Polyadenylierungssignal TATAAA

(Darstellung des nicht kodierenden DNA-Stranges)

Das reife Polypeptid besitzt ein Molekulargewicht von ca. 34 kd, so daß seine Länge auf etwa 340 Aminosäuren geschätzt werden kann. Demzufolge repräsentiert das cDNA-Fragment mit seiner Kodierungskapazität von 170 Aminosäuren etwa 50% des 34kd-Strukturpolypeptides. Nach Kuwabara und Murata (1982) besteht das Strukturpolypeptid aus 305 Aminosäuren (vgl. Diskussion). In Tabelle VII ist die Kodonnutzung für das 34kd-Polypeptid (Bruchstück) des Wasserspaltungskomplexes von Spinat wiedergegeben. Hieraus geht hervor, daß die "Wobble-Position" der Kodons zu etwa 60% durch C und G besetzt ist.

Tabelle VII : Kodonnutzung für das 34kd-Polypeptid (Bruchstück), abgeleitet aus der cDNA-Sequenz des Klons pSoc34kd

	T		C		A		G		
T	Phe	2	Ser	1	Tyr	2	Cys	-	T
	Phe	6	Ser	4	Tyr	3	Cys	-	C
	Leu	1	Ser	2	Stopp	1	Stopp	-	A
	Leu	4	Ser	4	Stopp	-	Trp	1	G
C	Leu	5	Pro	3	His	-	Arg	3	T
	Leu	2	Pro	2	His	-	Arg	-	C
	Leu	1	Pro	1	Gln	3	Arg	1	A
	Leu	-	Pro	4	Gln	4	Arg	-	G
A	Ile	2	Thr	1	Asn	1	Ser	5	T
	Ile	4	Thr	8	Asn	3	Ser	-	C
	Ile	-	Thr	1	Lys	3	Arg	1	A
	Met	1	Thr	2	Lys	9	Arg	-	G
G	Val	6	Ala	4	Asp	2	Gly	8	T
	Val	7	Ala	1	Asp	9	Gly	2	C
	Val	1	Ala	3	Glu	3	Gly	4	A
	Val	1	Ala	1	Glu	12	Gly	6	G

III.D.5. Die cDNA-Sequenz eines Klons für die SSU der Ribulose-1,5-bis-phosphatcarboxylase/oxygenase

Das untersuchte cDNA-Fragment der SSU von Spinat ist ohne die endständigen G- und C-Polymere 248 bp lang. Terminale A-Polymere, wie bei den cDNA-Fragmenten für PC, LHCP, DEL und das 34kd-Polypeptid, existieren bei dem cDNA-Fragment für SSU nicht. Das cDNA-Fragment für SSU besitzt an seinem 3'-Ende das Triplett AAG, das für die Aminosäure Lysin (Lys) kodiert, so daß anzunehmen ist, daß die SSU-cDNA das Degradationsprodukt einer größeren cDNA darstellt. Die cDNA-Sequenz zeigt ein durchgehendes Leseraster, das mit dem Kodon ATG beginnt und in 3'-Richtung durch das Ende des cDNA-Fragmentes begrenzt ist (vgl. Abb. 22 und 23). Die 177 bp des Leserasters kodieren für 59 Aminosäuren. Sie repräsentieren das komplette SSU-Transitpolypeptid und die ersten beiden Aminosäuren des SSU-Strukturpolypeptides. Die AT-haltige Region (ca. 70% AT) vor der kodierenden Sequenz entspricht der nicht kodierenden 5'-Region der SSU-mRNA.

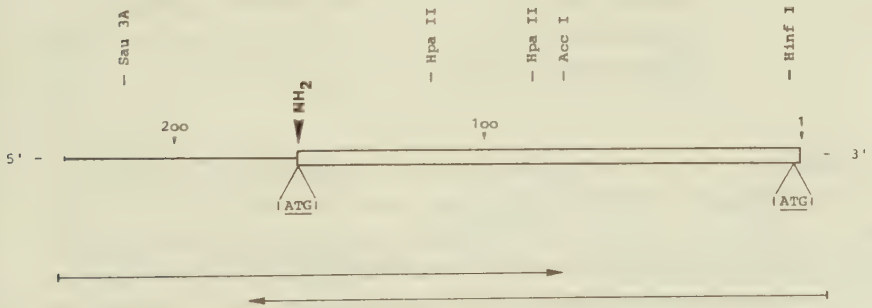


Abb. 22 : Physikalische Karte der cDNA für die SSU (Klon pSocSSU)

Abkürzungen, Zeichen : entsprechend Abb. 12
Sequenzen : siehe Text
$\rightarrow NH_2$: N-Terminus der abgeleiteten Aminosäuresequenz

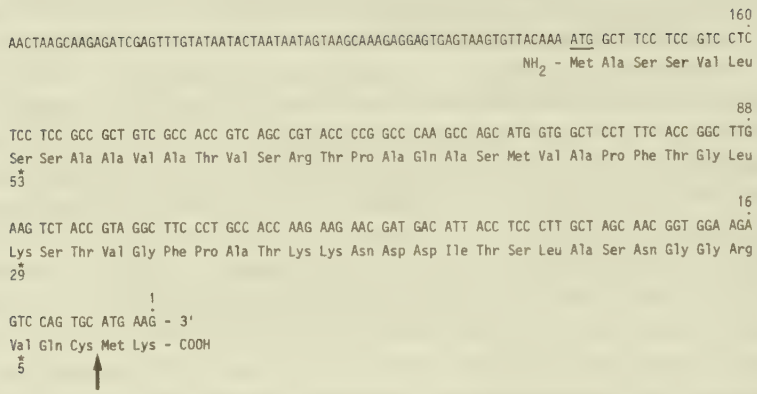


Abb. 23 : Nukleotidsequenz der cDNA für die SSU (Klon pSocSSU) mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz für das SSU-Transitpolypeptid

29 : Aminosäureposition
16 : Nukleotidposition
—— : Initiationskodon ATG
↑ : potentielle Spaltstelle der SSU-Polypeptidvorstufe

Die Sequenz des SSU-Transitpolypeptides ist bis heute neben Spinacia oleracea (vorliegende Arbeit) auch bei Pisum sativum (Cashmore, 1983; Coruzzi et al., 1984), Glycine max (Berry-Lowe et al., 1982), Lemna gibba (Stiekema et al., 1983), Nicotiana tabacum (Mazur et al., 1985) und Triticum aestivum (Broglie et al., 1983) vollständig bekannt. Die Aminosäuresequenzen der Transitpolypeptide wurden entweder aus nukleären oder aus cDNA-Sequenzen abgeleitet. Allen SSU-Transitpolypeptiden ist gemeinsam, daß sie als N-terminale Verlängerungen der Strukturpolypeptide auftreten. Ihre Längen variieren für die genannten Spezies von 47 (Triticum) bis 57 Aminosäuren (Spinacia, Pisum, Nicotiana und Lemna). Für Homologievergleiche wurden ihre Aminosäuresequenzen in Abb. 24 zusammengefaßt. Die Abbildung enthält sowohl die Aminosäuresequenz des SSU-Transitpolypeptides von Spinat, die aus der cDNA-Sequenz (Spinacia 1) abgeleitet wurde, als auch die Aminosäuresequenz, die mit der genomischen DNA-Sequenz korrespondiert (Spinacia 2).

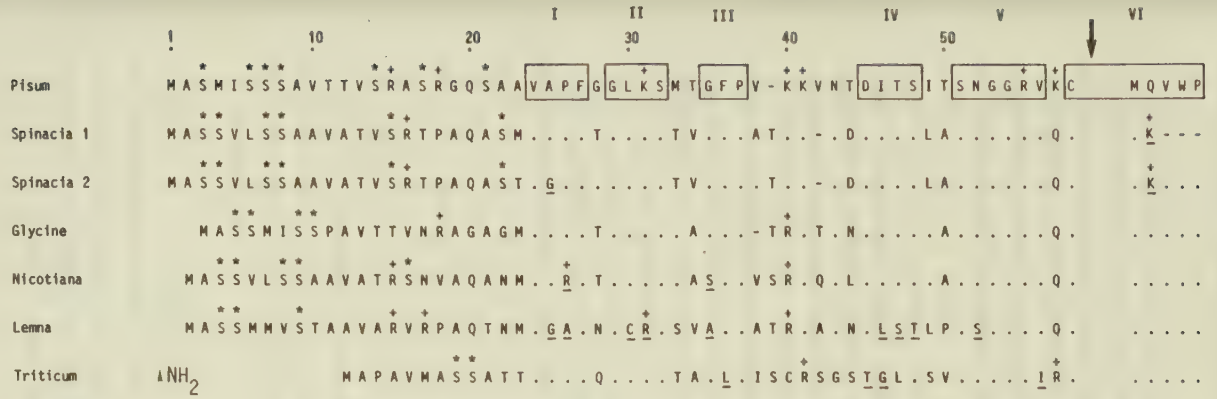


Abb. 24 : Vergleich der Aminosäuresequenzen von SSU-Transitpolypeptiden der Spezies Pisum, Spinacia (1 und 2) Glycine, Nicotiana, Lemna und Triticum (Sequenzen im "Einbuchstabenkode")

I-VI	:	konservierte Sequenzabschnitte (Abschnitt VI enthält hier die letzte Aminosäure der Transitsequenz und die Aminosäuren 1-5 des Strukturpolypeptides)
20	:	Aminosäureposition
.....	:	Aminosäuren, die mit der Vergleichssequenz von Pisum identisch sind
*	:	Serinreste des N-terminalen Sequenzbereiches
+	:	positive Ladung der Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K); gebräuchlicher "Einbuchstabenkode"
-	:	deletierte Aminosäuren
↓	:	potentielle Spaltstelle der SSU-Vorstufe beim Import in den Chloroplasten
L	:	von der Vergleichssequenz (Pisum) abweichende Aminosäuren der Bereiche I-VI (z.B. Leucin)
NH_2	:	N-Terminus

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der SSU-Transitpolypeptide verschiedener Pflanzenspezies zeigt, daß sie mehrere interessante Gemeinsamkeiten besitzen (vgl. Abb. 24):

1. Sie beginnen N-terminal mit der Aminosäure Methionin (Met) und enden C-terminal auf Cystein (Cys). Das Dipeptid Cys-Met (VI), wobei Cys zum Transitpolypeptid und Met zum Strukturpolypeptid gehört und die benachbarten Aminosäuren (V) sind konserviert. Die SSU-Polypeptidvorstufe wird beim Transport in den Chloroplasten zwischen diesen beiden Aminosäureresten gespalten.

2. Sie sind unter physiologischen Bedingungen durch die Aminosäuren Arginin (Arg) und Lysin (Lys) positiv geladen. Die Positionen von Arg (V) und Lys (II) sind konserviert. Über die positiv geladenen Aminosäuren erfolgt möglicherweise die Bindung der SSU-Polypeptidvorstufe an die negativ geladene Chloroplastenmembran. Es wären auch Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Aminosäureresten des Transitpolypeptides mit den negativ geladenen Aminosäureresten des Strukturpolypeptides bei der Ausbildung der Tertiärstruktur der Polypeptidvorstufe denkbar.

3. Der N-terminale Bereich des Transitpolypeptides enthält zahlreiche apolare Aminosäuren wie Alanin (Ala) oder Valin (Val) und die nur mäßig polare Aminosäure Serin (Ser).

III.E. Import zellfrei synthetisierter, kernkodierter Polypeptide in isolierte, intakte Spinatchloroplasten

Eine Vielzahl plastidärer Polypeptide wird durch die nukleäre DNA kodiert und an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert. Diese Polypeptide müssen die Chloroplastenhülle passieren, um die plastidären Proteinkomplexe zu erreichen mit denen sie assoziiert sind. Die plastidären, kernkodierten Polypeptide werden als höhermolekulare Vorstufen synthetisiert und bei ihrem Import in den Chloroplasten zum reifen Polypeptid prozessiert (vgl. Diskussion). Der Import und die gekoppelte Reifung der höhermolekularen Vorstufen lassen sich in vitro mit zellfrei synthetisierten plastidären Polypeptiden und isolierten, intakten Chloroplasten nachvollziehen. Darüber hinaus können die mit ^{35}S-Methionin markierten Polypeptide in ihren korrekten topologischen Positionen im Chloroplasten nachgewiesen werden (vgl. Diskussion).

In der vorliegenden Arbeit wurden solche Importuntersuchungen mit zellfrei synthetisierten, kernkodierten Polypeptiden und isolierten, intakten Chloroplasten auch bei Spinat durchgeführt. Dazu wurden intakte Chloroplasten nach der Methode von Bartlett et al. (1982) isoliert und mit Polypeptiden inkubiert, die im zellfreien Translationssystem aus Weizenkeimen synthetisiert und dabei mit ^{35}S-Methionin markiert worden waren (vgl. II.I.2.). Die Importuntersuchungen wurden sowohl mit Polypeptidpopulationen, die aus Gesamt-Poly(A)$^+$-RNA synthetisiert wurden, als auch mit einzelnen Polypeptidvorstufen (pSSU, pPC, pLHCP) vorgenommen, für die hybridselektierte mRNA-Spezies bei der zellfreien Translation als Matrize dienten. Der Reaktionsansatz für den Polypeptidimport war nach Bartlett et al. (1982) durchgeführt worden (II.I.3.). Um zu zeigen, daß die angebotenen Polypeptidvorstufen während des Importes prozessiert werden und als reife Polypeptide in ihren korrekten topologischen Positionen im Chloroplasten vorliegen, wurden die löslichen und membranassoziierten Chloroplastenproteine getrennt isoliert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch analysiert (vgl. II.I.4. und II.I.5.).

In Abb. 25 ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Analyse löslicher (A) sowie membranassoziierter Chloroplastenproteine (B und C) nach dem Import zellfrei synthetisierter Polypeptide wiedergegeben. Die ersten Bahnen von A, B und C zeigen die mit Coomassie Blau angefärbten Muster der isolierten löslichen Polypeptide (A1) und der Polypeptide der Thylakoidmembran (B1 und C1), die aus Mem-

branpräparationen stammen, die nur mit 150 mM NaCl (B1) oder sowohl mit 150 mM NaCl, als auch mit 2 M NaBr (C1) gewaschen worden waren (vgl. II.I.4.). Alle übrigen Bahnen der Abbildung stellen Fluorogramme der entsprechenden Polypeptidmuster dar. Die Fraktion löslicher Proteine (A1) zeigt vornehmlich die beiden Untereinheiten (LSU und SSU) der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase. Diese beiden Untereinheiten liegen in stöchiometrischem Verhältnis vor. Das zugehörige Fluorogramm der lösliche Proteine nach der Inkubation der Chloroplasten mit der zellfrei synthetisierten SSU-Vorstufe (A2) zeigt erwartungsgemäß nur ein Signal bei 14 kd, das das reife SSU-Polypeptid repräsentiert. Die Größe der zum Import angebotenen Vorstufe betrug 20 kd. Zur Kontrolle wurde den Chloroplasten auch eine Polypeptidpopulation in einem separaten Reaktionsansatz angeboten, die aus Gesamt-Poly(A)$^+$-RNA zellfrei synthetisiert worden war. Das zugehörige Fluorogramm der Fraktion löslicher Proteine zeigt A3. Analoge Ergebnisse zeigen sich zum Import der Polypeptidvorstufen für PC (B) und LHCP (C). Die mit Coomassie Blau angefärbten Polypeptide der Thylakoidmembran (B1 und C1) zeigen ein komplexes Muster, wobei die LHC-Polypeptide quantitativ dominieren. Plastocyanin ist als authentisches Polypeptid in dem gezeigten Muster nicht sichtbar, da es nicht zu den abundanten Polypeptiden der Thylakoidmembran gehört. Die zum Import angebotene PC-Vorstufe (21 kd) wird prozessiert, in den Chloroplasten aufgenommen und als reifes Polypeptid (10 kd) mit der Thylakoidmembran verbunden (B2). Die Bindung des Plastocyanin an die Thylakoidmembran ist nur schwach, da Plastocyanin ein membranperipheres Polypeptid ist. Unter veränderten Salzbedingungen (2M NaBr) kann es von der Membran abgelöst werden. Die Vorstufen der LHC-Polypeptide (25-29 kd) werden ebenfalls importiert, zu reifen Polypeptiden (21-25 kd) prozessiert und in die Thylakoidmembran integriert (C2). Im Gegensatz zum Plastocyanin sind die LHC-Polypeptide als Transmembranpolypeptide (siehe Diskussion) fest in der Membran verankert, so daß sie selbst unter stringenten Waschungsbedingungen (2 M NaBr) nicht aus der Thylakoidmembran gelöst werden können.

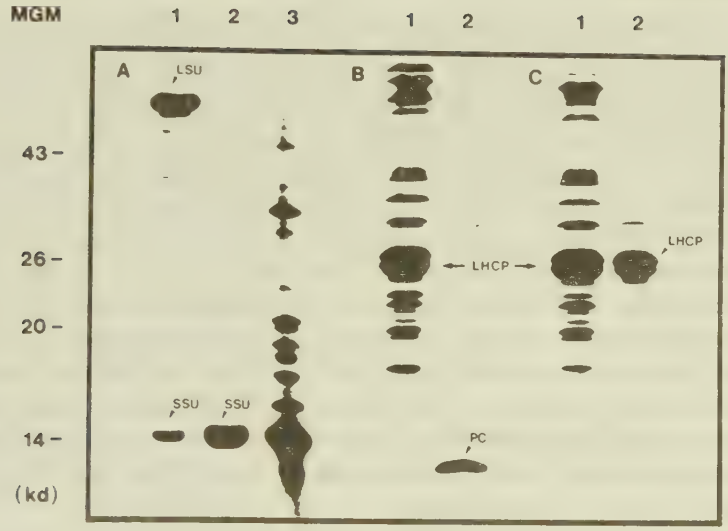


Abb. 25 : Gelelektrophoretische Analyse löslicher und membranassoziierter Chloroplastenproteine nach dem Import zellfrei synthetisierter Polypeptide

A : lösliche Chloroplastenproteine
1 : angefärbt mit Coomassie Blau (LSU und SSU dominieren)
2 : Fluorogramm (nach dem Import der SSU-Vorstufe)
3 : Fluorogramm (nach dem Import einer Polypeptidpopulation, die aus Poly(A)$^+$-RNA synthetisiert wurde)

B : membranassoziierte Chloroplastenproteine (NaCl-Waschung)
1 : angefärbt mit Coomassie Blau (LHC-Polypeptide dominieren)
2 : Fluorogramm (nach dem Import der PC-Vorstufe)

C : membranassoziierte Chloroplastenproteine (NaCl- + NaBr-Waschung)
1 : angefärbt mit Coomassie Blau (LHC-Polypeptide dominieren)
2 : Fluorogramm (nach dem Import der LHCP-Vorstufen)

← : importierte, prozessierte und in ihre korrekte topologische Position gebrachte Polypeptide (SSU, PC, LHCP)

MGM : Molekulargewichtsmarker in kd (vgl. II.E.1.)

Gel : 15-20% PAA (vgl. II.I.5.)

III.F. Genomische Klonierung

Nach der erfolgreichen Selektion und Charakterisierung spezifischer cDNA-Sequenzen stand die Isolation entsprechender nukleärer Gene im Mittelpunkt meines Interesses. Eine Voraussetzung für dieses Ziel ist die Konstruktion einer umfangreichen genomischen Klonbank, der im allgemeinen die Auswahl eines geeigneten Vektorsystems vorausgeht (siehe Diskussion). Für die Klonierung der genomischen DNA von Spinat wurde das Lambda-System und der Vektor EMBL4 ausgewählt. Der Vektor ist ein sogenannter "Replacement-Vektor", bei dem ein Mittelfragment von ca. 14 kd durch Fremd-DNA ersetzt werden kann. Das Mittelfragment wird beiderseits durch eine invers angeordnete multiple Klonierungssequenz flankiert, so daß es mit den Restriktionsendonukleasen SalI, BamHI und EcoRI exzisiert werden kann. Zur Familie der EMBL-Vektoren gehören auch EMBL1, EMBL2 und EMBL3, die allesamt Derivate des Lambda-Vektors 1059 (Karn et al., 1980) darstellen. Ihre Klonierungskapazität reicht von 9 kb bis 23 kb. Konstruktion und Verwendungsmöglichkeiten der EMBL-Vektoren wurden bei Frischauf et al. (1983) beschrieben.

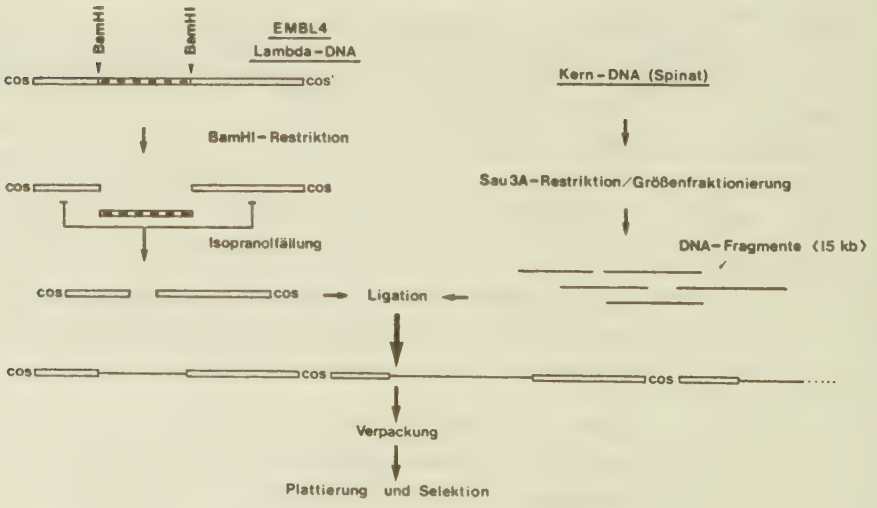


Abb. 26 : Schema zur Klonierung genomischer DNA (Erklärungen im Text)

Die Konstruktion der genomischen Klonbank begann mit der Präparation hochmolekularer, nukleärer DNA. Die DNA wurde dann mit der Restriktionsendonuklease Sau3A partiell restringiert und über einen Saccharosegradienten fraktioniert. Die DNA-Fragmente der Größenordnung 10-20 kb wurden extrahiert und in den mit BamHI restringierten EMBL4-Vektor ligiert. Die rekombinante DNA konnte anschließend im FTL/SE-Extrakt, der nach der Methode von Maniatis et al. (1982) präpariert worden war, in vitro verpackt werden. Die Phagenpopulation wurde sukzessive auf dem Wirtsbakterium NM 539 plattiert und nach der Methode von Benton und Davis (1977) mit cDNA-Sonden analysiert. Die gesamte Prozedur der genomischen Klonierung ist in Abb. 26 wiedergegeben.

III.F.1. Präparation nukleärer DNA aus Zellkernen

Zur Erstellung einer genomischen Klonbank kann entweder zelluläre oder nukleäre DNA eingesetzt werden. Die Verwendung nukleärer DNA setzt die Isolation von Zellkernen voraus, minimiert aber die Kontamination der Klonbank durch plastidäre und mitochondrielle Sequenzen. Die von mir verwendete Methode zur Isolierung von Zellkernen nach Willmitzer und Wagner (1981) ist an Pflanzenzellen aus Gewebekulturen (Kalli und Suspensionskulturen) etabliert worden. Die Methode ließ sich jedoch problemlos auf Pflanzenmaterial aus dem Gewächshaus übertragen. Der eigentlichen Organellisolierung geht in dem Verfahren die Inkubation der Pflanzenzellen in einer Enzymlösung (Pektinase und Zellulase) voraus. Dadurch wird das Gewebe tonizitätsmäßig äquilibriert und eine partielle Auflösung der Zellwandstrukturen erreicht, so daß die Zellen mechanisch leichter aufgebrochen werden können. Diese Vorbehandlung ist besonders bei Suspensionskulturen wegen der hohen Elastizität der Zellen notwendig. Auf eine solche Vorinkubation konnte bei der vorliegenden Arbeit verzichtet werden, da sie die Qualität der Zellkerne und der DNA nicht beeinflußte. In Abb. 27 ist ein Ausschnitt aus einer solchen Zellkernpräparation von Spinat wiedergegeben.

Die extrahierte und gereinigte Kern-DNA wurde routinemäßig einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dazu wurde die DNA mit den Restriktionsendonukleasen HindIII, EcoRI und BamHI restringiert und über ein 0,5%-iges Agarosegel pherographiert. Als Qualitätskriterien galten hierbei die gute Restringierbarkeit der DNA und die Reproduzierbarkeit der Restriktionsmuster (Abb. 28).

Die deutlich hervortretenden Banden enthalten wohl repetitive DNA-Sequenzen (Flavell, 1982). Ein solches Muster repetitiver Sequenzen kann gewissermaßen als Fingerabdruck eines Genoms betrachtet werden (Nathans und Smith, 1975). Es wurde zur Bestimmung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen Pflanzenspezies der gleichen Familie herangezogen.

Abb. 27 :

Ausschnitt aus einer Zellkernpräparation von Spinat

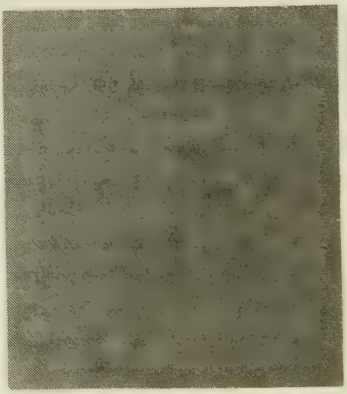


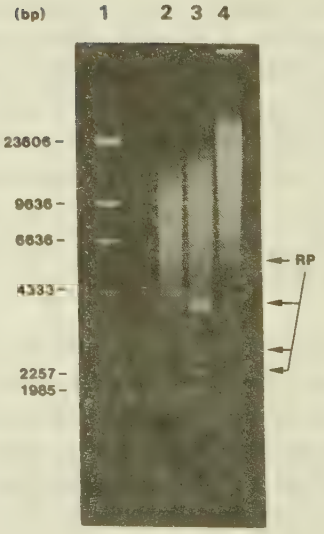
Abb. 28 :

Restriktionsanalyse nukleärer DNA aus Zellkernen von Spinat

Die nukleäre DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und über ein 0,5%-iges Agarosegel pherographiert (Ethidiumbromidfärbung)

1 : Längenstandard (Lambda/HindIII)
2 : HindIII-Restriktion
3 : EcoRI-Restriktion
4 : BamHI-Restriktion

RP : repetitive DNA-Segmente



III.F.2. Partialrestriktion und Fraktionierung nukleärer DNA

Durch die Verwendung von EMBL4 als Klonierungsvektor war die Größe der klonierbaren, nukleären DNA-Fragmente vorgegeben. Um eine möglichst große Menge verschiedener DNA-Fragmente von 10-20 kb zu erzeugen, wurde das relativ häufig schneidende Restriktionsenzym Sau3A verwendet, dessen Erkennungssequenz aus vier Nukleotiden besteht. Die Strategie der Partialrestriktion ist unter II.J.6. beschrieben. Die restringierte, nukleäre DNA wurde im Saccharosegradienten (vgl. II.J.7.) fraktioniert und Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden zur Größenbestimmung gelelektrophoretisch überprüft (vgl. Abb. 29). Die DNA aus Fraktion 3 besaß die geeignete Größe (10-20 kb) für die Klonierung.

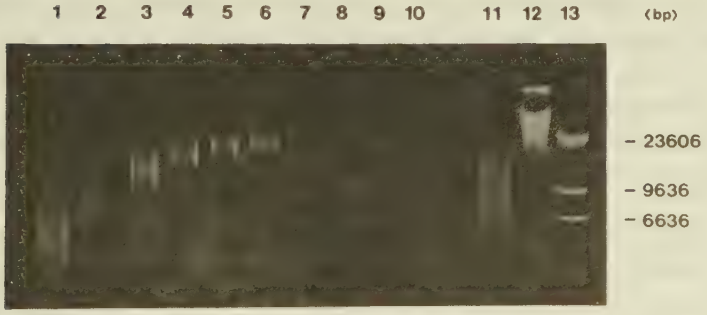


Abb. 29 : Gelelektrophoretische Analyse Sau3A-partialrestringierter und fraktionierter, nukleärer DNA

1-10 : DNA-Fraktionen aus dem Saccharosegradienten
11 : mit Sau3A partiell restringierte nukleäre DNA
12 : unverdaute nukleäre DNA
13 : Längenstandard (Lambda-DNA/HindIII; Ausschnitt)
Gel : 0,5%-iges Agarosegel (Ethidiumbromidfärbung)

III.F.3. Qualität der genomischen Klonbank

Um eine qualitativ hochwertige, genomische Klonbank zu erstellen, müssen alle Komponenten und Einzelreaktionen der Klonierungsprozedur optimiert werden. Dazu sind umfangreiche Tests notwendig die gleichermaßen die präparierten DNA-Komponenten (nukleäre und Vektor-DNA), die Ligationsreaktion, den Verpackungsextrakt, die verwendeten Wirtsbakterien und die Medien betreffen. Nur unter diesen Voraussetzungen läßt sich eine genomische Klonbank erstellen, von der zu erwarten ist, daß sie auch Sequenzen geringer Abundanz enthält. Für die Klonierung pflanzlicher, nukleärer DNA sind die genannten Optimierungstests von besonderer Bedeutung, da sich pflanzliche Kern-DNA erfahrungsgemäß schlechter klonieren läßt als etwa tierische (B. Hohn, persönliche Mitteilung).

III.F.3.1. Testligationen mit nukleärer und Vektor-DNA

Eine EMBL4/DNA-Präparation, die zur Klonierung verwendet werden sollte, wurde auf 3 Ebenen getestet, und zwar als :

1. ungeschnittene EMBL4-DNA
2. BamHI-restringierte EMBL4-DNA
3. BamHI/SalI-restringierte EMBL4-DNA (nach der Isopropanolfällung II.K.4.3.)

Von jeder Vektorform wurde 1 µg in einem 5 µl Ansatz ligiert (vgl. II.K.4.4.) und verpackt. Aliquote der Phagenpartikel wurden dann seriell verdünnt und auf dem Wirtsbakterium DH1 (vgl. III.F.3.4.) plattiert. Der Stamm DH1 läßt das Wachstum von EMBL4-Phagen uneingeschränkt zu. Die Auszählung der Plaques sollte für ungeschnittene EMBL4-DNA etwa 5×10^8 Plaques/µg DNA, für BamHI-restringierte EMBL4-DNA ca. 5×10^7 Plaques/µg DNA und für BamHI/SalI-restringierte EMBL4-DNA keine nennenswerte Plaqueszahlen ergeben. Wenn diese Voraussetzungen erfüllt waren, wurde die BamHI/SalI-restringierte EMBL4-DNA zur Klonierung verwendet. Anderenfalls mußte neue Vektor-DNA präpariert werden.

Die nukleäre DNA wurde ebenfalls einem Ligationstest unterzogen. Hierzu wurde 1 µg restringierte Kern-DNA mit sich selbst ligiert und anschließend über ein 0,5%-iges Agarosegel pherographiert. Die ligierte Kern-DNA mußte ein erheblich größeres Molekulargewicht besitzen als die unligierte. Außerdem sollte

keine DNA vom Molekulargewicht unligierter DNA mehr vorhanden sein, was die Intaktheit der Fragmentenden anzeigt.

III.F.3.2. Test des Verpackungssystems

Die Verpackung von Lambda-DNA in vitro wurde erstmals von B.Hohn und Th.Hohn (1974) beschrieben. Mit dem Wissen um die Morphogenese von Bakteriophage Lambda (Th.Hohn und J.Katsura, 1977) und der Möglichkeit zur in vitro Verpackung der Lambda-DNA konnte das Lambda-System sehr schnell zur Klonierung und zum Studium rekombinanter DNA eingesetzt werden (B.Hohn und K.Murray, 1977; Sternberg et al., 1977).

Das Verpackungssystem setzt sich aus zwei einander ergänzenden Extrakten zusammen (FTL und SE), die getrennt voneinander nach Maniatis et al. (1982) präpariert worden waren. Dabei ist die Komponente SE ein Beschallungsextrakt, der aus dem Bakterienstamm BHB 2690 (Genotyp: s.u.) präpariert wurde. Die Komponente FTL ist ein Gefrier-Tau-Extrakt, der aus dem Bakterienstamm BHB 2688 gewonnen wurde (Genotyp: s.u.). Beide Bakterienstämme tragen lysogene Lambda-DNA mit Mutationen in diversen Genen. Die Konstruktion dieser Stämme und die Bedeutung der Mutationen wurde von B.Hohn (1979) ausführlich beschrieben.

Tabelle VIII : Genotypen der Bakterienstämme BHB 2690 und BHB 2688

BHB 2688 : N205 recA$^-$ (λimm434 cIts b2 red3 Eam4 Sam7)/λ
BHB 2690 : N205 recA$^-$ (λimm434 cIts b2 red3 Dam15 Sam7)/λ

Die Qualität der beiden Extrakte variiert sehr stark von Präparation zu Präparation. Deshalb wurden 4-5 Präparationen gleichzeitig erstellt und dann getestet. Ungeschnittene EMBL4-DNA diente beim Qualitätstest des Verpackungssystems als Referenz. Eine Präparation (FTL + SE) mußte etwa 5 x 10^8 Plaques pro µg EMBL4-DNA liefern, um für die Verpackung rekombinanter DNA geeignet zu sein. Als Wirtsbakterium diente hier wieder DH1.

III.F.3.3. Test der Ligationsbedingungen

Neben der Qualität des Verpackungssystemes ist für die Klonierung das richtige Verhältnis von Vektor-DNA zu nukleärer DNA im Ligationsansatz von entscheidender Bedeutung. Das günstigste, molare Verhältnis von nukleärer DNA (Insert) zu den Armen des Vektors ist theoretisch 1:2 (jedem nukleären Molekül steht dann je ein Molekül eines jeden der beiden Vektorarme zur Verfügung). Unter Berücksichtigung der Längenheterogenität der nukleären DNA und anderer Unsicherheitsfaktoren wurden auch Ligationsansätze verwendet, denen Insert/Arm-Verhältnisse von 1:4 bis 1:1 zugrunde lagen. Die DNA-Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bestimmt. Darüberhinaus mußte auch die Gesamtmenge an DNA im Ligationsansatz berücksichtigt werden. Eine zu geringe DNA-Konzentration begünstigt die Zirkularisation der Moleküle, wohingegen eine hohe DNA-Konzentration die Bildung von Konkatameren favorisiert. Die Ligationsansätze enthielten mindestens 1 µg DNA/5 µl Ligationsansatz. Dies erwies sich als am brauchbarsten.

Die DNA der einzelnen Ligationsansätze wurde danach in vitro verpackt. Aliquote der Verpackungsansätze wurden auf den Wirtsbakterien DH1, NM 538 und NM 539 plattiert (s.u.). Anhand der Plaquesauszählung auf dem Wirt NM 539 ergab sich das zunächst günstigste Insert/Arm-Verhältnis. Um den Ansatz weiter zu optimieren, wurde darauf das ermittelte Verhältnis in feinen Abstufungen variiert. Auf diese Weise konnte die Klonierungseffizienz bis auf etwa 10^6 Plaques/µg DNA (nukleäre + Vektor-DNA) gesteigert werden. Dies entsprach etwa dem Zehnfachen der üblichen Ausbeute bei pflanzlicher DNA, die im allgemeinen bei ca. 10^5 Plaques/µg DNA liegt (B.Hohn, persönliche Mitteilung).

III.F.3.4. Die verwendeten Wirtsbakterienstämme

Im Rahmen der genomischen Klonierung wurden routinemäßig 3 verschiedene Bakterienstämme von E.coli (DH1, NM 538 und NM 539) mit unterschiedlichen, selektierenden Eigenschaften verwendet.

Alle essentiellen Lambda-Funktionen sind auf den Armen des EMBL4-Vektors lokalisiert. Das Mittelfragment, das durch Fremd-DNA ersetzt werden kann, enthält die Gene red und gamma, die bei der Phagenrekombination eine Rolle spie-

len. Ein Phage, der diese beiden Gene besitzt, wächst auf einem recA$^+$ Wirtsbakterium (NM 538, s.u.), nicht aber auf einem recA$^+$ Wirtsbakterium, das den Prophagen P2 enthält (NM 539). Der Phenotyp wird spi$^+$ (sensitive to P2 interference) genannt (Zissler et al., 1971; Lindahl et al., 1970). Fehlen dem Phagen jedoch die Gene red und gamma durch den Austausch des Mittelfragmentes mit nukleärer DNA, so besitzt er einen spi$^-$ Phenotyp, d.h. der Phage wächst dann auch auf dem P2 tragenden Wirtsbakterium NM 539. Verwendet man ein recA$^-$ Wirtsbakterium (DH1, s.u.), so wachsen nur solche Phagen, die die Gene red und gamma noch besitzen (EMBL4-Phagen).

Tabelle IX : Wachstum der Phagentypen auf den verwendeten Wirtsstämmen

Bakterienstamm	chimäre Phagen	EMBL4-Phagen
NM 538 recA$^+$	+	+
NM 539 recA$^+$ P2	+	-
DH1 recA$^-$	-	+

Anhand der Plattierungsergebnisse auf diesen 3 Wirtsstämmen lassen sich Aussagen über die Effizienz von Ligation und Verpackung (NM 538), den Umfang der Klonbank (NM 539) und die Kontamination der Klonbank durch EMBL4-Phagen (DH1) machen. Der Anteil von kontaminierenden EMBL4-Phagen blieb stets unter 1%.

III.G. Selektion und Identifizierung nukleärer Gene für SSU, PC und LHCP aus Spinat

III.G.1. Selektion des SSU-Genes durch Hybridisierung

Für die Selektion des nukleären SSU-Genes aus der genomischen Klonbank wurden zunächst 50 Agarplatten (12 x 12 cm) mit je ca. 3000 Plaques erstellt (insgesamt ca. 150000 Plaques). Die Plaques wurden nach der Methode von Benton und Davis (1977) auf Nitrozellulose transferiert und lysiert. Die DNA wurde dann auf der Nitrozellulose fixiert (vgl. II.L.2.). Von jeder Agarplatte wurden 2 identische Abzüge angefertigt. Zur Hybridisierung wurde ein Sub-

fragment (Sau3A/HinfI-Restriktionsprodukt) der sequenzierten SSU-cDNA (vgl. physikalische Karte zur SSU-cDNA, III.D.5.). Das etwa 220 bp lange DNA-Fragment wurde terminal mit (α ^{32}P)-dATP markiert (II.N.8.1.) und mit den Nitrozellulosefiltern unter Hybridisierungsbedingungen für homologe DNA inkubiert (vgl. II.L.3.).

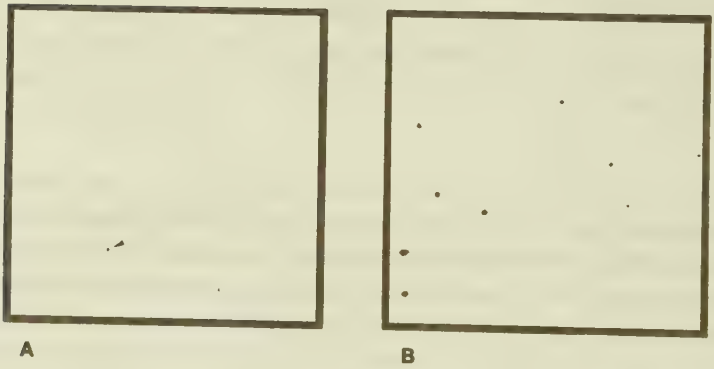


Abb. 30 : Selektion eines SSU-Genes von Spinat aus der genomischen Lambda-Klonbank durch Hybridisierung mit einer cDNA für SSU (Klon pSocSSU)

A und B zeigen Autoradiogramme zur Hybridisierung der cDNA für SSU gegen rekombinante EMBL4-Phagen, die von Agarplatten auf Nitrozellulose übertragen worden waren (Methode nach Benton und Davis, 1977)

A : Originalplatte →(Signal: selektierter Klon λSonSSU)
B : 1. Replattierung (Anreicherung und Reinigung von λSonSSU)

Abb. 30 A gibt das Ergebnis dieser Hybridisierung wieder. Der hier selektierte Klon ist der genomische SSU-Klon λSonSSU. Die zugehörige Agarplatte zeigte ca. 3000 Plaques, so daß das Signal nicht eindeutig einem einzelnen Plaque zugeordnet werden konnte. Deshalb wurde im Signalbereich ein Areal von etwa 5 x 5 mm (6-8 Plaques) aus der Agarplatte ausgestochen. Die Phagen wurden extrahiert, replattiert und erneut mit ^{32}P-markiertem cDNA-Fragment hybridisiert (vgl. Abb. 30 B). Die Phagendichte wurde so gewählt, daß sie 2-3 Plaques/cm^2 Agarplatte betrug. Etwa 5% der plattierten Phagen enthielten dann das SSU-Gen von Spinat. Unter diesen Bedingungen war gewährleistet, daß ein Signal eindeutig einem Plaque zugeordnet und der Plaque kontaminationsfrei entnommen werden konnte. Mit zwei weiteren, aufeinanderfolgenden Replattierungen und Hybridisierungen wurde sichergestellt, daß die Phagenpopulation homogen war. Erst nach diesen Testexperimenten wurden die Phagen in Suspensionskulturen herangezogen und die rekombinante DNA für Folgeexperimente extrahiert.

III.G.2. Selektion weiterer nukleärer Gene durch Hybridisierung

Im Rahmen der Diplomarbeit von Ch. Rother (1985) gelang unter meiner Beteiligung die Selektion und Isolation eines genomischen Klons für PC (Plastocyanin) und drei genomischer Klone für LHC-Polypeptide (Chlorophyll a/b-bindende Polypeptide des Antennenkomplexes des Photosystems II). Diese genomischen Klone stammten aus einer Lambda-Klonbank, die aus EcoRI-partialrestringierter Kern-DNA von Spinat und dem Lambda-Vektor EMBL4 erstellt wurde. Die Sichtung der Klonbank und die Selektion der genannten Klone erfolgte durch Hybridisierung mit *in vitro* synthetisierter, einzelsträngiger RNA. Hierfür waren getrimmte cDNA-Fragmente der Plasmide pSocPC und pSocLHCP (III.C.1.) in die Vektoren pSP64 und pSP65 (Melton et al., 1984) kloniert worden. Beide Vektoren enthalten den starken *Salmonella typhimurium* SP6-Bakteriophagenpromotor in Nachbarschaft zur multiplen Klonierungsstelle, in die die getrimmten cDNAs inseriert wurden. Die rekombinanten Plasmide dienten nach ihrer Reinigung und Linearisierung als Matrize für die *in vitro* "run off"-Transkription, die durch die RNA-Polymerase aus Bakteriophage SP6 infizierten Zellen von *Salmonella typhimurium* katalysiert wird. Die Hybridisierung der ^{32}P-markierten, *in vitro* synthetisierten RNA gegen rekombinante Lambda-DNA wurde gemäß II.L. vorgenommen. Erste Untersuchungen der selektierten Lambda-Klone lassen vermuten, daß sie verschiedene LHCP-Gene tragen. Eingehende Analysen werden derzeitig durchgeführt.

III.G.3. Identifizierung des SSU-Genes durch Hybridselektion und RNA-Translation

Analog zur Hybridselektion mit cDNA-Klonen wurde auch bei dem genomischen SSU-Klon verfahren. Hierzu wurden ca. 50 µg der rekombinanten Lambda-DNA beschallt, denaturiert und an APTE-Sephacryl S-500 gebunden. Nach der Inkubation mit Poly(A)$^+$-RNA wurde die selektierte RNA eluiert und im Kaninchen-Retikulocytenlysat *in vitro* translatiert. Die Translationsprodukte wurden über ein PAA-Gradientengel pherographiert und fluorographiert (vgl. II.E.). Abb. 31 zeigt die Fluorographie des entsprechenden Gels. Hieraus geht eindeutig hervor, daß sowohl der cDNA-Klon (pSocSSU) als auch der genomische Klon (λSonSSU) die mRNA für die SSU der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase selektieren. Das Translationsprodukt ist in beiden Fällen die SSU-Vorstufe (pSSU). Darüber hinaus erscheint bei der genomischen DNA kein zusätzliches Translationssignal, das auf die Exsistenz eines weiteren Genes hindeutet, das für ein Polypeptid kodiert.

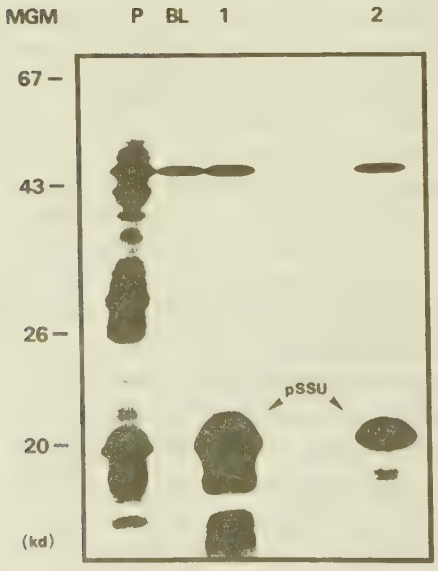


Abb. 31 :

Ergebnis zur Hybridselektion der SSU-mRNA mit dem genomischen Klon λSonSSU (^{35}S-Fluorographie)

Die selektierten mRNAs wurden im Retikulocytenlysat translatiert und die Translationsprodukte über ein 10-15% iges PAA-Gel pherographiert.

P : Translationskontrolle (Poly(A)$^+$-RNA)

BL: Translation ohne exogene RNA

1 : mRNA-Selektion mit λSonSSU-DNA

2 : mRNA-Selektion mit pSocSSU-DNA

MGM : Molekulargewichtsmarker in kd (vgl. II.E.1.)

III.H. Physikalische Kartierung des SSU-Genes von Spinat

Nachdem der genomische Klon λSonSSU durch die Hybridisierung mit der SSU-cDNA und durch die Selektion und Translation der SSU-mRNA eindeutig als Träger der genomischen SSU-Sequenz identifiziert worden war, empfahl sich zunächst seine physikalische Kartierung, um die Größe und die Orientierung der genomischen Sequenzen zu bestimmen. Später wurde die genomische SSU-DNA auch sequenziert, um die molekulare Organisation des SSU-Gens zu determinieren.

III.H.1. Restriktionskartierung der λSonSSU-DNA

Für die Übersichtskartierung der λSonSSU-DNA wurden die Restriktionsendonukleasen BamHI, EcoRI und SalI verwendet, da diese Enzyme relativ selten schneiden und außerdem beim Klonierungsvektor EMBL4 charakteristische Restriktionsfragmente liefern. Somit konnte die Übersichtskarte vorwiegend durch Einzelrestriktionen mit den genannten Enzymen und den direkten Vergleich der Restriktionsmuster von EMBL4- und λSonSSU-DNA erstellt werden. Charakteristische Restriktionsstellen (BamHI, EcoRI und SalI) der EMBL4-DNA wurden bereits unter III.F. erwähnt. Eine genaue Karte des Vektors für die Restrikionsenzyme, die bei der Kartierung der λSonSSU-DNA von Bedeutung sind, ist in der Abb. 32 A wiedergegeben.

Infolge der invers angeordneten multiplen Klonierungssequenzen entstehen bei der Restriktion der EMBL4-DNA mit EcoRI und BamHI (Abb. 33, Bahn 4 und 8) die gleichen DNA-Fragmente und zwar der lange Vektorarm (LA = 19,4 kb), das Mittelfragment (MF = 13,7 kb) und der kurze Vektorarm (KA = 9,3 kb). Bei der SalI-Restriktion der Vektor-DNA entstehen ebenfalls die Vektorarme LA und KA (19,4 und 9,3 kb). Das Mittelfragment MF wird jedoch in 3 Subfragmente von 8,4 kb, 4,8 kb und 0,5 kb zerlegt (Abb. 33, Bahn 6).

Die BamHI-Restriktion der λSonSSU-DNA erzeugt dagegen nur 2 DNA-Fragmente, wovon das kleinere dem Vektorarm KA entspricht. Demzufolge besteht das größere Fragment aus dem Vektorarm LA und zusätzlicher DNA (vgl. Bahn 7 und 8). Die EcoRI-Restriktion der λSonSSU-DNA (Bahn 3) erzeugt 6 DNA-Fragmente von etwa 19,4 kb (LA), 14,7 kb (MF+A), 9,3 kb (KA), 2,2 kb (C), 1,3 kb (D) und 0,8 kb (B). Die EcoRI-Fragmente von 19,4 kb und 9,3 kb entsprechen den Vektorarmen

LA und KA (vgl. Bahn 3 und 4). Gemäß dem Bauprinzip der Lambda-DNA müssen die übrigen Fragmente zwischen den Vektorarmen lokalisiert sein. Da das 14,7 kb Fragment (MF+A) der EcoRI-Restriktion etwa die Größe des Mittelfragmentes (MF) der EMBL4-DNA besitzt, wurde die λSonSSU-DNA mit SalI restringiert (Bahn 5). Hierbei entstanden 3 Fragmente von 9,3 kb (KA), 8,4 kb und 4,8 kb und ein sehr großes Fragment von mehr als 23 kb (LA+A+B+C+D). Das 9,3 kb Fragment entspricht dem Vektorarm KA, und die Fragmente von 8,4 und 4,8 kb besitzen die gleiche Größe wie die beiden großen SalI-Subfragmente des EMBL4-Mittelfragmentes (MF) Das kleinste Subfragment von MF (0,5 kb) fehlt dem Mittelfragment (MF+A) der λSonSSU-DNA (vgl. Bahn 5 und 6). Das größte SalI-Fragment der λSonSSU-DNA (s.o.) enthält folglich neben dem Vektorarm LA auch die EcoRI-Fragmente B, C, D und das EcoRI/SalI-Fragment A (s.o.). Die Summe aller Subfragmente A-D der klonierten, nukleären DNA beträgt ca. 5,3 kb.

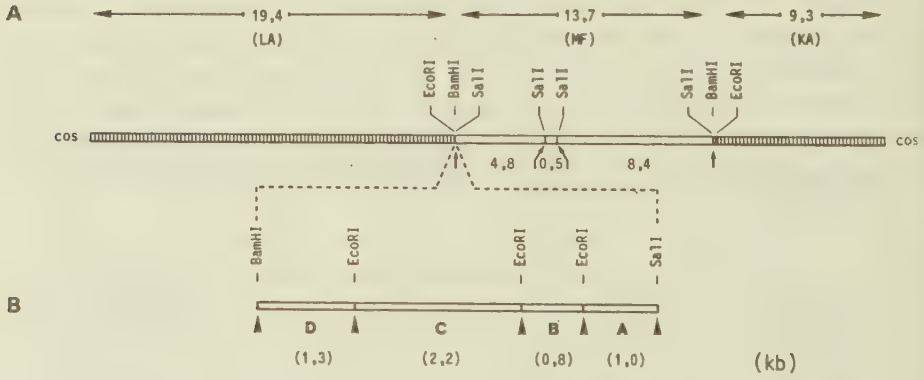


Abb. 32 : Physikalische Karte des EMBL4-Vektors und des klonierten genomischen DNA-Segmentes des Klons λSonSSU

A : Karte des klonierten, genomischen Fragmentes des Klons
B : λSonSSU mit den EcoRI-Subfragmenten B, C, D und dem EcoRI/SalI-Subfragment A
(sonstige Abkürzungen und Zeichen: siehe Text)

cos : langer und kurzer Vektorarm

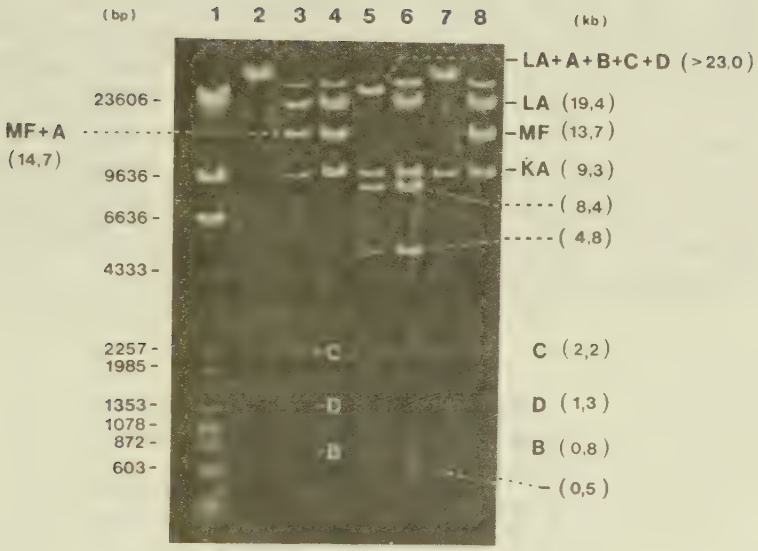


Abb. 33 : Gelelektrophoretische Analyse der rekombinanten DNA des genomischen Klons λSonSSU

Die rekombinante DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und über ein 0,5%-iges Agarosegel pherographiert.

1 : Längenstandards (Lambda/HindIII und ØX 174/HaeIII)
2 : EMBL4-DNA unverdaut
3 : λSonSSU-DNA/EcoRI
4 : EMBL4-DNA/EcoRI
5 : λSonSSU-DNA/SalI
6 : EMBL4-DNA/SalI
7 : λSonSSU-DNA/BamHI
8 : EMBL4-DNA/BamHI

LA : langer Vektorarm
KA : kurzer Vektorarm
MF : Mittelfragment des Vektors EMBL4
B,C,D : EcoRI-Subfragmente des genomischen DNA-Fragmentes
A : EcoRI/SalI-Subfragment des genomischen DNA-Fragmentes

III.H.2. Partialrestriktion der klonierten, nukleären DNA mit EcoRI

Zur Bestimmung der Reihenfolge der EcoRI-Fragmente A, B, C und D in der genomischen λSonSSU-DNA bot sich die Kartierung durch partielle Restriktion an (Smith und Birnstiel, 1976). Die Strategie dieser Methode wurde unter II.M.1. ausführlich beschrieben. Aus der SalI-Restriktion der λSonSSU-DNA ging hervor, daß das größte Fragment (>23 kb) den Vektorarm LA und die sich anschließenden Fragmente A-D in ihrer natürlichen Reihenfolge enthielt (s.o.). Das genannte SalI-Fragment wurde isoliert, dann einseitig mit (α^{32}P)-dCTP markiert (vgl. II.N.8.1.) und mit EcoRI partiell restringiert. Anhand der Ergebnisse der Partialrestriktion (Abb. 34) konnte die Übersichtkarte der λSonSSU-DNA konstruiert werden (vgl. Abb. 32 B).

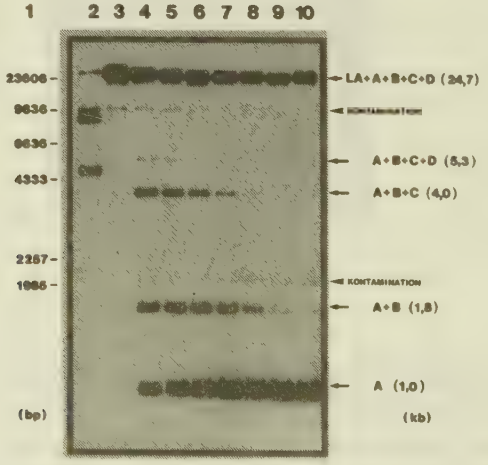


Abb. 34 : Bestimmung der Reihenfolge der Subfragmente A, B, C und D im genomischen DNA-Fragment des Klons λSonSSU

(Zeitabhängige Restriktion des größten SalI-Fragmentes der λSonSSU-DNA mit EcoRI (zur Strategie vgl. II.M.1. und III.H.2.)

Abb. : pherographierte Restriktionsprodukte (Autoradiographie)

1 : Längenstandard (Lambda/HindIII) 2 : λSonSSU-DNA/SalI

3 : SalI-Fragment der λSonSSU-DNA (>23 kb)

4-10 : SalI-Fragment partiell mit EcoRI verdaut (zeitabhängig)

LA : langer Vektorarm A,B,C,D : Subfragmente des genomischen DNA-Fragmentes

III.H.3. Lokalisation des SSU-Genes auf der λSonSSU-DNA

Nachdem die Reihenfolge der Fragmente A-D bestimmt worden war, mußte ermittelt werden, welche von ihnen Sequenzen des SSU-Genes tragen. Hierzu wurden die Fragmente A-D in das Plasmid pUC18 kloniert (vgl. II.N.8.3.). Für die spätere Sequenzierung wurden die gentragenden Fragmente in beiden Orientierungen benötigt. Die klonierten Fragmente wurden dann getrennt zur RNA-Selektion eingesetzt (vgl. II.E.3.). Die selektierten mRNA-Spezies wurden in vitro translatiert und die Translationsprodukte über ein PAA-Gel (denaturierende Bedingungen) pherographiert. Das Ergebnis der Untersuchung machte deutlich, daß nur die Fragmente B und C die SSU-mRNA selektierten. Die Fragmente A und D selektierten offenbar keine mRNA (keine Translationsprodukte).

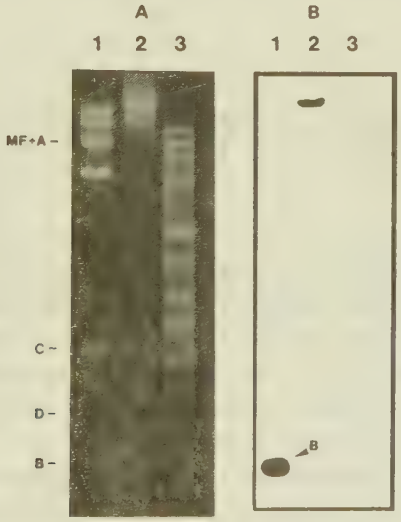


Abb. 35 : Ergebnis der Hybridisierung ^{32}P-markierter cDNA für SSU (Klon pSocSSU) gegen EcoRI-restringierte λSonSSU-DNA

A : pherographierte Restriktionsprodukte (0,5%-iges Agarosegel)

B : zugehörige Autoradiographie (Filterhybridisierung mit SSU-cDNA)

1 : λSonSSU-DNA/EcoRI (A-D: Subfragmente der genomischen DNA)

2 : λSonSSU-DNA unverdaut 3 : ptDNA/BamHI

MF : Mittelfragment der EMBL4-DNA

Um die Orientierung des SSU-Genes auf den Fragmenten B und C zu ermitteln, wurde das in III.G.1. beschriebene Sau3A/HinfI-Subfragment der SSU-cDNA, das die Transitsequenz kodiert, als Hybridisierungsprobe verwendet. Die λSonSSU-DNA wurde dazu mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und über ein Agarosegel pherographiert. Die Restriktionsfragmente wurden dann auf Nitrozellulose transferiert und mit dem terminal ^{32}P-markierten cDNA-Subfragment hybridisiert.

Das Ergebnis dieser Hybridisierung zeigt Abb. 35. Hieraus geht hervor, daß das Fragment B solche DNA-Sequenzen enthalten muß, die für das SSU-Transitpolypeptid kodieren. Das Fragment C hybridisierte nicht mit dem cDNA-Fragment. Damit war relativ sicher, daß das Fragment C Sequenzen enthalten mußte, die für das SSU-Strukturpolypeptid kodieren. Die Orientierung des SSU-Genes auf dem klonierten, nukleären DNA-Fragment (5,3 kb Fragment) war somit ermittelt (vgl. physikalische Karte des 5,3 kb Fragmentes, III.K.).

III.J. Hybridisierung der nukleären λSonSSU-Subfragmente A-D gegen Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA

Die Ergebnisse der RNA-Selektion mit der gesamten λSonSSU-DNA (vgl. III.G.3.), als auch mit den EcoRI-Subfragmenten A-D (III.H.3.) haben gezeigt, daß die nukleäre DNA mit ihrer Größe von ca. 5,3 kb neben dem SSU-Gen kein weiteres Gen zu enthalten scheint, das für ein Polypeptid kodiert. Um zu überprüfen, ob andere RNAs außer mRNA-Spezies ihren Ursprung auf der nukleären DNA haben, wurden die Fragmente A-D separat gegen Poly(A)$^+$- und Poly(A)$^-$-RNA hybridisiert. Die dazu verwendete Technik ("Northern Transfer") ist unter II.H. beschrieben worden. Die Hybridisierungsproben (genomische Fragmente A-D) waren dazu terminal mit (α ^{32}P)-dATP markiert worden. Die Hybridisierungen gegen Poly(A)$^-$-RNA waren für alle Hybridisierungsproben negativ (keine Signale) und sind daher nicht gezeigt. Die Autoradiographie zur Hybridisierung gegen Poly(A)$^+$-RNA (Abb. 36) zeigt deutliche Signale für die Fragmente B und C sowie für die Referenz (SSU-cDNA). In diesen Fällen hybridisieren die Proben gegen die SSU-mRNA (ca. 950 b). Für die Fragmente A und D exsistieren keine RNA-Äquivalente.

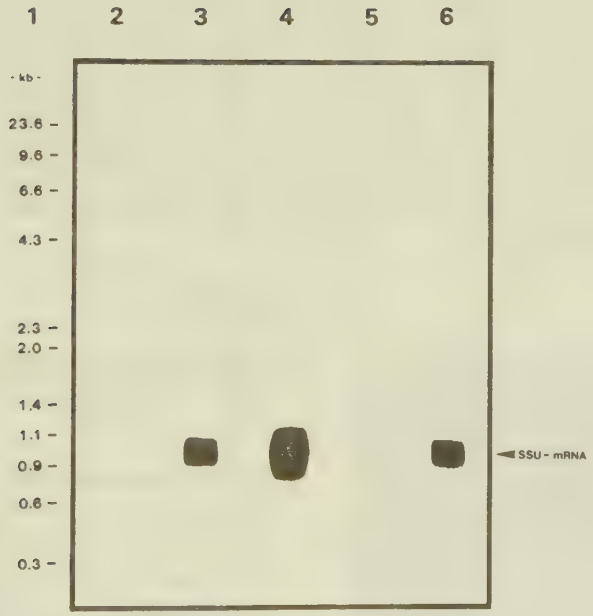


Abb. 36 : Hybridisierung der nukleären DNA-Fragmente A-D gegen Poly(A)$^+$-RNA

Poly(A)$^+$-RNA, die über ein 1,5%-iges Agarosegel aufgetrennt worden war, wurde auf Nitrozellulose transferiert und separat mit den ^{32}P-markierten, genomischen DNA-Fragmenten A-D hybridisiert.

Längenstandard (Lambda/HindIII und ØX 174/HaeIII) (1)
Hybridisierung mit : Fragment A (2) Fragment B (3)
Fragment C (4) Fragment D (5)
cDNA-Fragment aus Klon pSocSSU (6)

III.K. Die molekulare Organisation des SSU-Genes von Spinat

Das klonierte, genomische DNA-Fragment ist 5,3 kb lang. Es besteht aus drei EcoRI-Fragmenten (B, C, D) sowie einem EcoRI/SalI-Fragment (A). Die nachfolgende Sequenzanalyse zeigt, daß die beiden Fragmente B und C das komplette SSU-Gen enthalten. Das Fragment B wurde vollständig, das Fragment C zum Teil sequenziert. In Abb. 37 sind beispielhaft die Autoradiographien zweier Sequenzierungsgele wiedergegeben. Die Abb. 38 A zeigt eine Obersichtskarte des klonierten, genomischen DNA-Fragmentes (5,3 kb). In Abb. 38 B sind die physikalische Feinkarte des SSU-Genes mit seinen Exon- und Intronstrukturen und die Sequenzierungsstrategie wiedergegeben. In Abb. 39 ist die Sequenz des SSU-Genes mit allen wichtigen Signalen und der korrespondierenden Aminosäuresequenz dargestellt.

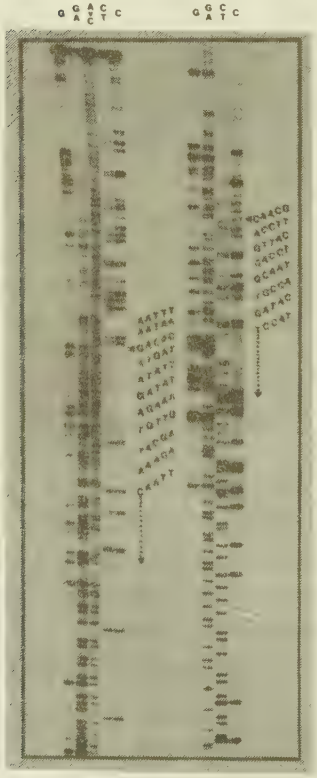


Abb. 37 :

Zwei Beispiele für 6%-ige Sequenzierungsgele (Autoradiographien)

Die Sequenzierung wurde nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) mit den Reaktionen A, A+G, (A>C), C+T und C auf 12, 6 und 4%-igen PAA-Gelen durchgeführt. Die aufgeführten Sequenzen gehören zur genomischen DNA des Klons λSonSSU.

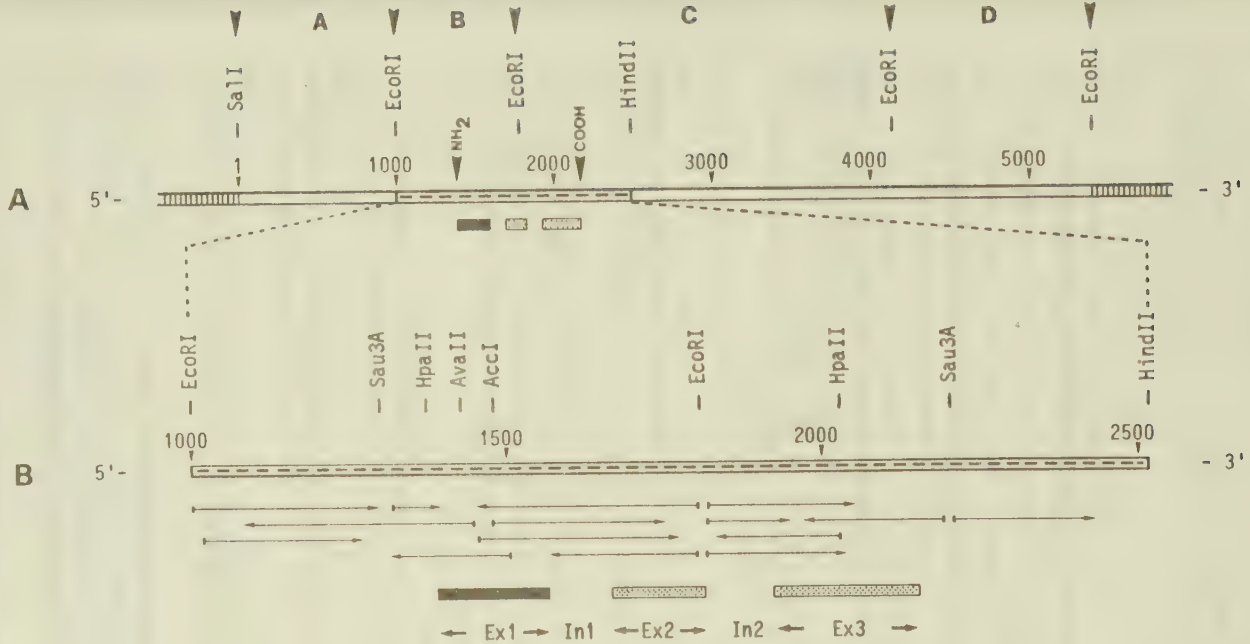


Abb. 38 : Physikalische Übersichtskarte des klonierten, genomischen DNA-Fragmentes mit dem SSU-Gen (A) und die physikalische Feinkarte des gentragenden, sequenzierten DNA-Segmentes (B) (Klon λSonSSU)

: Vektor-DNA
: genomische DNA (nicht sequenziert)
: genomische DNA (sequenziert)
: SSU-Transitpolypeptid
: SSU-Strukturpolypeptid
: Sequenzierungsstrategie

1000 : Längenangabe in Basenpaaren
NH_2 : N-Terminus des SSU-Polypeptides
COOH : C-Terminus des SSU-Polypeptides
Ex, In : Exon- (EX) und Intronbereiche (In)
A : Grenzen der EcoRI- bzw. EcoRI/SalI-Subfragmente A, B, C und D

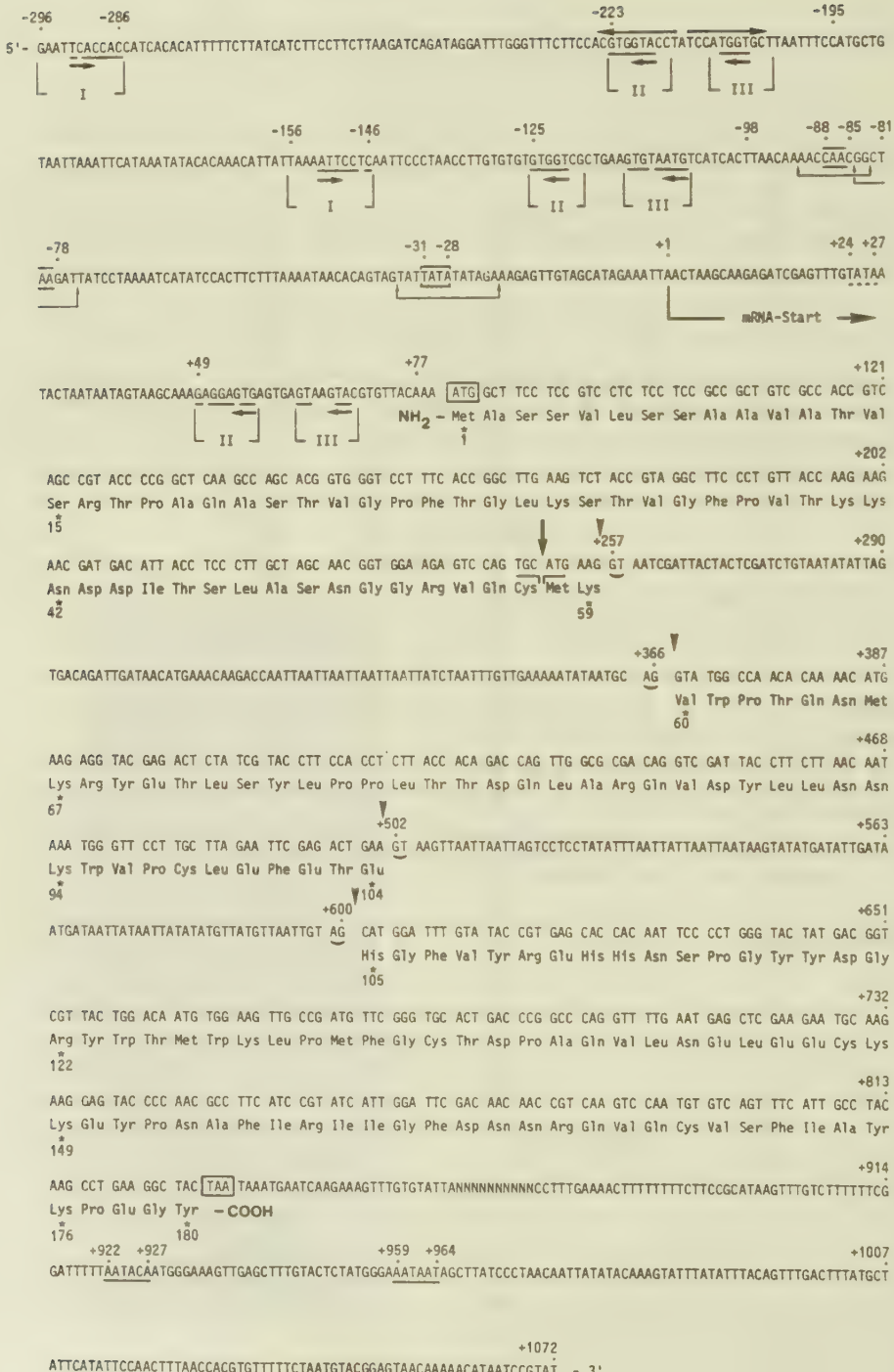

-296
-286
-223
-195
5'- GAATTCACCACCATCACACATTTTTCTTATCATCTTCCTTCTTAAGATCAGATAGGATTTGGGTTTCTTCCACGTGGTACCTATCCATGGTGCTTAATTTCCATGCTG
I
II
III
-156
-146
-125
-98
-88 -85 -81
TAATTAAATTCATAAATATACACAAACATTATTAAAATTCCTCAATTCCCTAACCTTGTGTGTGTGGTCGCTGAAGTGTAATGTCATCACTTAACAAAACCAACGGCT
I
II
III
-78
-31 -28
+1
+24 +27
AAGATTATCCTAAAATCATATCCACTTCTTTAAAATAACACAGTAGTATTATATATAGAAAGAGTTGTAGCATAGAAATTAACTAAGCAAGAGATCGAGTTTGTATAA
mRNA-Start
+49
+77
+121
TACTAATAATAGTAAGCAAAGAGGAGTGAGTGAGTAAGTACGTGTTACAAA ATG GCT TCC TCC GTC CTC TCC TCC GCC GCT GTC GCC ACC GTC
II
III
NH2 - Met Ala Ser Ser Val Leu Ser Ser Ala Ala Val Ala Thr Val
1
+202
AGC CGT ACC CCG GCT CAA GCC AGC ACG GTG GGT CCT TTC ACC GGC TTG AAG TCT ACC GTA GGC TTC CCT GTT ACC AAG AAG
Ser Arg Thr Pro Ala Gln Ala Ser Thr Val Gly Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Thr Val Gly Phe Pro Val Thr Lys Lys
15
+257
+290
AAC GAT GAC ATT ACC TCC CTT GCT AGC AAC GGT GGA AGA GTC CAG TGC ATG AAG GT AATCGATTACTACTCGATCTGTAATATATTAG
Asn Asp Asp Ile Thr Ser Leu Ala Ser Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Lys
42
59
+366
+387
TGACAGATTGATAACATGAAACAAGACCAATTAATTAATTAATTATCTAATTTGTTGAAAAATATAATGC AG GTA TGG CCA ACA CAA AAC ATG
Val Trp Pro Thr Gln Asn Met
60
+468
AAG AGG TAC GAG ACT CTA TCG TAC CTT CCA CCT CTT ACC ACA GAC CAG TTG GCG CGA CAG GTC GAT TAC CTT CTT AAC AAT
Lys Arg Tyr Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Thr Thr Asp Gln Leu Ala Arg Gln Val Asp Tyr Leu Leu Asn Asn
67
+502
+563
AAA TGG GTT CCT TGC TTA GAA TTC GAG ACT GAA GT AAGTTAATTAATTAGTCCTCCTATATTTAATTATTAATTAATAAGTATATGATATTGATA
Lys Trp Val Pro Cys Leu Glu Phe Glu Thr Glu
94
+600
104
+651
ATGATAATTATAATTATATATGTTATGTTAATTGT AG CAT GGA TTT GTA TAC CGT GAG CAC CAC AAT TCC CCT GGG TAC TAT GAC GGT
His Gly Phe Val Tyr Arg Glu His His Asn Ser Pro Gly Tyr Tyr Asp Gly
105
+732
CGT TAC TGG ACA ATG TGG AAG TTG CCG ATG TTC GGG TGC ACT GAC CCG GCC CAG GTT TTG AAT GAG CTC GAA GAA TGC AAG
Arg Tyr Trp Thr Met Trp Lys Leu Pro Met Phe Gly Cys Thr Asp Pro Ala Gln Val Leu Asn Glu Leu Glu Glu Cys Lys
122
+813
AAG GAG TAC CCC AAC GCC TTC ATC CGT ATC ATT GGA TTC GAC AAC AAC CGT CAA GTC CAA TGT GTC AGT TTC ATT GCC TAC
Lys Glu Tyr Pro Asn Ala Phe Ile Arg Ile Ile Gly Phe Asp Asn Asn Arg Gln Val Gln Cys Val Ser Phe Ile Ala Tyr
149
+914
AAG CCT GAA GGC TAC TAA TAAATGAATCAAGAAAGTTTGTGTATTANNNNNNNNNNCCTTTGAAAACTTTTTTTTCTTCCGCATAAGTTTGTCTTTTTTCG
Lys Pro Glu Gly Tyr -COOH
176
180
+922
+927
+959
+964
+1007
GATTTTTAATACAATGGGAAAGTTGAGCTTTGTACTCTATGGGAAATAATAGCTTATCCCTAACAATTATATACAAAGTATTTATATTTACAGTTTGACTTTATGCT
+1072
ATTCATATTCCAACTTTAACCACGTGTTTTTCTAATGTACGGAGTAACAAAAACATAATCCGTAT - 3'

Abb. 39 :

Nukleotidsequenz des SSU-Genes von Spinat (Klon λSonSSU) mit seinen 5'- und 3'-flankierenden Bereichen und der abgeleiteten Aminosäuresequenz für die SSU

*180 : Aminosäureposition
+1072 : Nukleotidposition
NH_2- : N-Terminus des SSU-Polypeptides
-COOH : C-Terminus des SSU-Polypeptides
5'-, -3': 5'- und 3'-Ende der DNA-Sequenz (nicht kodierender DNA-Strang)
↓ : potentielle Spaltstelle der Polypeptidvorstufe
GT, AG : zentrale Nukleotide der Exon/Intron- (GT) und Intron/Exon-Grenzen (vgl. Tabelle XI)
▼ : Spaltstellen des Primärtranskriptes (Intronexzision)
ATG : Initiationskodon der Translation
TAA : Terminationskodon der Translation
+1 : potentieller Startpunkt des Primärtranskriptes

Wichtige Sequenzen (vgl. Text)

+922 +927 +959 +964
AATACA und AATAAT : potentielle Polyadenylierungssignale (vgl. III.K.2.)

-31 -28
TATTATATATAGA : TATA-Sequenz I mit Umgebung (vgl. III.K.3.2.1.)

+24 +27
TATA : TATA-Sequenz II (vgl. III.K.3.2.1.)

-81 -78
GGCTAAGAT : CAAT-Sequenz I mit Umgebung und zentralen Nukleotiden (vgl. III.K.3.2.2.)

-88 -85
AACCAACGG : CAAT-Sequenz II mit Umgebung und zentralen Nukleotiden

-296 -286
GAATTCACCAC : essentielle Sequenzbereiche (I, II, III) potentieller "Enhancer" des SSU-Genes (Beispiel) (vgl. III.K.3.2.3.) (zugehörige Zeichen entsprechen denen in Abb. 43)
I
-223
CGTGGTACCTATCCATGGTGC : identische, invers angeordnete Segmente

Anhand der Sequenz des SSU-Genes und seiner 5'- und 3'-flankierenden Bereiche können Aussagen zur molekularen Organisation des Genes gemacht werden. Das SSU-Gen aus Spinat enthält 3 Exons und 2 Introns unterschiedlicher Länge. Dabei kodiert Exon 1 (Ex1) für das Transitpolypeptid und die beiden ersten Aminosäuren (Met-Lys) des Strukturpolypeptides. Das Exon 2 (Ex2) und das Exon 3 (Ex3) kodieren ausschließlich für das Strukturpolypeptid (insgesamt für 121 AS). Exon 1 und Exon 2 sind durch das Intron 2 (In2 von Nukleotid +257 bis +366), Exon 2 und Exon 3 durch das Intron 2 (In2 von Nukleotid +502 bis +600) getrennt (vgl. Abb. 38 B und 39). In der Tabelle X sind einige Daten zu den Exon- und Intronstrukturen (Länge, AT-Gehalt, Kodierungskapazität) zusammengefaßt. Die Summe der Aminosäuren aus Exon 2 und Exon 3 zuzüglich der beiden letzten Aminosäuren von Exon 1 (Met-Lys) ergibt für das reife SSU-Polypeptid eine Länge von 123 Aminosäuren. Das Ergebnis stimmt mit dem von Martin (1979) überein, der durch die Sequenzierung des reifen SSU-Polypeptides ebenfalls 123 Aminosäuren ermittelt hat. Die beiden Introns (In1 und In2) sind mit 77% und 85% wesentlich AT-haltiger als die drei Exons (Ex1, Ex2, Ex3). Außerdem enthalten die Introns in allen 3 möglichen Leserastern zahlreiche Stoppkodons.

Tabelle X : Eigenschaften der Intron- und Exonstrukturen des SSU-Genes

Exon/Intron	Länge	AT-Gehalt	Kodierungskapazität
Exon 1 (Ex1)	177 N	41 %	59 AS
Intron 1 (In1)	110 N	77 %	-
Exon 2 (Ex2)	135 N	54 %	45 AS
Intron 2 (In2)	99 N	85 %	-
Exon 3 (Ex3)	228 N	50 %	76 AS
	(N = Nukleotide)		(AS = Aminosäuren)

Bei der Exzision der Intronteile aus dem Primärtranskript während seiner Reifung werden die Exontranskripte miteinander verbunden, so daß eine reife mRNA mit nicht unterbrochenem Leseraster entsteht. Dieser Prozeß muß sehr präzise verlaufen und äußerst spezifisch sein. Aus vergleichenden Untersuchungen von

Breathnach und Chambon (1981) ist die GT/AG-Regel bekannt, wobei jedes Intronteil des Primärtranskriptes 5'-terminal mit GT beginnt und 3'-terminal auf AG endet. Der Vergleich von mehr als 100 Exon/Intron- (Donorseite) und Intron/Exon-Verbindungsstellen (Akzeptorseite) zeigt, daß auch die nähere Umgebung von GT und AG konserviert ist (Breathnach und Chambon, 1981; Mount, 1982). In der Tabelle XI sind die Konsensussequenzen für Donor- und Akzeptorseite mit den Verbindungssequenzen der Exons und Introns im SSU-Gen vergleichend dargestellt.

Tabelle XI : Sequenzvergleich der Exon/Intron- und Intron/Exon-Grenzen des SSU-Gens mit den Konsensussequenzen für Donor- und Akzeptorseiten nach Breathnach und Chambon (1981)

			Homologie
Konsensussequenz (Donorseite)	:	5'- C/A A G G T A/G A G T - 3'	
		+257	
Exon 1/Intron 1	:	5'- A A G G T A A T C - 3'	78 %
		* * * * * * *	
		+502	
Exon 2/Intron 2	:	5'- G A A G T A A G T - 3'	78 %
		* * * * * * *	
Konsensussequenz (Akzeptorseite)	:	5'- C/T C/T C/T C/T C/T C/T N C/T A G G G/T - 3'	
		+366	
Intron 1/Exon 2	:	5'- T A T A A T G C A G G T - 3'	73 %
		* * * * * * * *	
		+600	
Intron 2/Exon 3	:	5'- T T A A T T G T A G C A - 3'	64 %
		* * * * * * * *	

* : Nukleotide, die mit denen der Konsensussequenzen übereinstimmen

— : zentrale Nukleotide der Exon/Intron- und Intron/Exon-Grenzen

+257 : Position des Nukleotides in der DNA-Sequenz des SSU-Genes

Die Tabelle XI zeigt, daß eine starke Homologie zwischen den Konsensussequenzen nach Breathnach und Chambon (1981) und den Verbindungssequenzen der Exons und Introns im SSU-Gen von Spinat besteht, besonders wenn man berücksichtigt, daß Teile der Verbindungssequenzen bereits zum kodierenden Exon gehören und damit dieser Sequenzbereich jeweilig durch Aminosäuren der verschiedenen Polypeptidsegmente determiniert wird.

In Tabelle XII ist die Kodonnutzung für die SSU-Polypeptidvorstufe von Spinat zusammengefaßt. Der Tabelle ist zu entnehmen, daß in der dritten, nicht konservierten Position der Kodons von Exon 2 nur 48% G und C vertreten sind, wohingegen bei Exon 3 etwa 63% und bei Exon 1 sogar 70% G und C in der entsprechenden Position vorzufinden sind. Bemerkenswert ist auch, daß das G/C-Verhältnis in der "Wobble Position" nur in Exon 2 ausgeglichen ist. In Exon 1 und Exon 3 liegt die Präferenz eindeutig bei C.

Tabelle XII : Kodonnutzung für die SSU-Polypeptidvorstufe, abgeleitet aus der genomischen DNA-Sequenz des Klons λSonSSU

	T	C	A	G	
T	Phe - - 1	Ser 1 - -	Tyr - - 1	Cys - - 1	T
	Phe 2 1 4	Ser 5 - 1	Tyr - 3 6	Cys 1 1 2	C
	Leu - 1 -	Ser - - -	Stp. - - 1	Stp. - - -	A
	Leu 1 1 2	Ser - 1 -	Stp. - - -	Trp - 2 2	G
C	Leu 1 4 -	Pro 2 2 2	His - - 1	Arg 1 - 4	T
	Leu 1 - 1	Pro - - 1	His - - 2	Arg - - -	C
	Leu - 1 -	Pro - 2 -	Gln 1 1 2	Arg - 1 -	A
	Leu - - -	Pro 1 - 2	Gln 1 2 1	Arg - - -	G
A	Ile 1 - 2	Thr - 2 1	Asn - 1 2	Ser - - 1	T
	Ile - - 2	Thr 6 1 -	Asn 2 2 3	Ser 3 - -	C
	Ile - - -	Thr - 2 1	Lys - 1 -	Arg 1 - -	A
	Met 2 1 2	Thr 1 - -	Lys 4 1 4	Arg - 1 -	G
G	Val 1 1 1	Ala 4 - -	Asp 1 1 -	Gly 2 - 1	T
	Val 4 1 2	Ala 3 - 3	Asp 1 1 3	Gly 2 - 1	C
	Val 1 1 1	Ala - - -	Glu - 2 3	Gly 1 - 2	A
	Val 1 - -	Ala - 1 -	Glu - 2 3	Gly - - 2	G
	Exon 1 2 3	1 2 3	1 2 3	1 2 3	

III.K.1. Die Aminosäuresequenz des SSU-Polypeptides

Exon 1, 2 und 3 enthalten die kodierenden Sequenzen des SSU-Genes. Ihre Kodierungsraster sind jedoch nicht phasengleich, so daß die reife SSU-mRNA mit durchlaufendem Kodierungsraster erst nach der Exzision der internen, nicht kodierenden Sequenzen aus der mRNA-Vorstufe entstehen kann. Exon 1 kodiert das SSU-Transitpolypeptid und die beiden ersten Aminosäuren des reifen Polypeptides. Seine Aminosäuresequenz wurde bereits beschrieben und mit den Sequenzen anderer SSU-Transitpolypeptide verglichen (vgl. III.D.5.).

Das reife SSU-Polypeptid von Spinat wird bis auf die ersten beiden Aminosäuren durch Exon 2 und Exon 3 kodiert. Die Aminosäuresequenz des aus der genomischen DNA-Sequenz abgeleiteten Polypeptides (Spinacia II) wurde mit der Aminosäuresequenz des SSU-Polypeptides aus Spinat, die von Martin (1979) durch die die Sequenzierung des Polypeptides (Spinacia I) ermittelt worden war, verglichen (Abb. 40). In diesen Sequenzvergleich wurden auch die SSU-Polypeptide von Pisum (Coruzzi et al., 1984; Pisum I und II), Glycine (Berry-Lowe et al., 1982), Lemna (Stiekema et al., 1983), Nicotiana (Mazur et al., 1985), Triticum (Broglie et al., 1983) und Anabaena (Nierzwicki-Bauer et al., 1984) einbezogen. Die Aminosäuresequenzen sind entweder aus DNA-Sequenzen abgeleitet oder durch die Sequenzierung des Polypeptides ermittelt worden. Die Länge des SSU-Polypeptides beträgt bei den dikotylen Pflanzenspezies Pisum, Spinacia und Nicotiana 123 AS. Für Glycine, die monokotylen Lemna und Triticum sowie das Cyanobakterium Anabaena variiert die Länge des Strukturpolypeptides zwischen 108 (Anabaena) und 128 Aminosäuren (Triticum).
Die Sequenzhomologie zwischen verschiedenen SSU-Polypeptiden der gleichen Spezies beträgt bei Pisum (Pisum I und II) etwa 92%, bei Spinacia (Spinacia I und II) jedoch nur 72%. Zwischen den dikotylen Pflanzenspezies Pisum (Pisum I und II), Spinacia (Spinacia I und II), Nicotiana und Glycine reduziert sich die Homologie auf ca. 57%. Bezieht man die monokotylen Spezies Lemna und Triticum in den Vergleich mit ein, so beträgt die Homologie nur noch 48%.

Aus der Abb. 40 geht jedoch hervor, daß bestimmte Sequenzabschnitte existieren, die nicht oder nur wenig divergent sind. Sie umfassen die Aminosäuren 1-5 (I), 10-19 (II), 49-51 (III), 58-76 (IV), 102-106 (V) und 108-117 (VI). Diese Sequenzbereiche sind zum Teil sogar bei dem Cyanobakterium Anabaena konserviert.

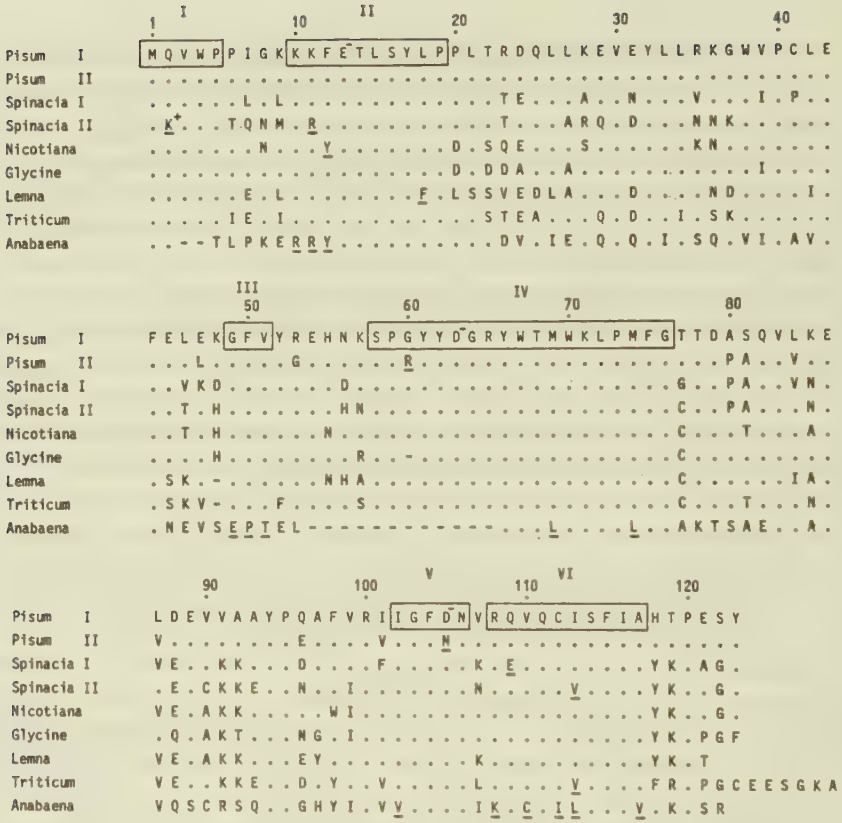


Abb. 40 : Vergleich der Aminosäuresequenzen reifer SSU-Polypeptide verschiedener Spezies (vgl. Text)

(Aminosäuresequenzen im gebräuchlichen "Einbuchstabenkode")

I-VI : konservierte Sequenzabschnitte

100 : Aminosäureposition

..... : Aminosäuren, die mit der Vergleichssequenz von Pisum I identisch sind

\- : deletierte Aminosäuren

D^-, E^- : neg. geladene Aminosäuren der konservierten Bereiche

R : von der Vergleichssequenz (Pisum I) abweichende Aminosäuren der konservierten Bereiche I-VI (z.B. Arginin)

(Pisum I und II sind aus DNA-Sequenzen abgeleitet worden)

Die konservierten Sequenzabschnitte (Pos. 10-19, 58-76, 102-106) sind vermutlich für die Bindung des SSU-Polypeptides an das LSU-Polypeptid bei der Bildung des Holoenzymes verantwortlich (siehe Diskussion). Die letzten Aminosäuren des SSU-Transitpolypeptides und die ersten Aminosäuren des reifen Polypeptides (vgl. Abb. 40 und Abb. 24) gelten als sehr konserviert, da hier die Polypeptidvorstufe prozessiert wird (Cys-Met). Das in dieser Arbeit gefundene SSU-Gen (Spinacia II) stellt hierin jedoch eine erste Ausnahme dar. Sowohl aus der DNA-Sequenz des SSU-Genes, als auch aus der cDNA der SSU wurde eine Aminosäuresequenz abgeleitet, bei der die 2. Aminosäure des reifen Polypeptides statt Glutamin (Gln), Lysin (Lys) ist. Hier wurde eine ungeladene Aminosäure (Gln) gegen eine, unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Aminosäure (Lys) ausgetauscht (vgl. Abb. 40).

Für die molekulare Organisation des SSU-Genes ist bemerkenswert, daß das erste Exon das Transitpolypeptid kodiert und die postulierten Funktionseinheiten des reifen Polypeptides (Bindung an die LSU) auf Exon 2 und Exon 3 verteilt sind (Exon 2 mit Aminosäure 10-19 (II); Exon 3 mit Aminosäure 58-76 (IV) und Aminosäure 102-106 (V). Dieses Ergebnis ist in Obereinstimmung mit der von Gilbert et al. (1979) aufgestellten Hypothese, daß Exons für funktionelle Domänen von Polypeptiden kodieren. Die gleiche Organisation wurde für SSU-Gene von Pisum (Coruzzi et al., 1984) und Glycine (Berry-Lowe et al. 1982) gefunden. Das SSU-Gen von Triticum (Broglie et al., 1983) enthält nur 2 Exons, von denen das eine das Transitpolypeptid, das andere das gesamte Strukturpolypeptid kodiert. Demgegenüber besitzt das SSU-Gen von Nicotiana (Mazur et al., 1985) 4 Exons, wobei das Transitpolypeptid wiederum durch ein Exon, das Strukturpolypeptid jedoch durch 3 Exons kodiert wird.

III.K.2. Die 3'-Region des SSU-Genes von Spinat

Die Transkription eines eukaryotischen Genes wird in seinem 3'-flankierenden, nicht kodierenden Bereich terminiert. Die Termination eukaryotischer Gene wurde bisher wenig untersucht und funktionelle Terminationssequenzen sind für pflanzliche Gene bisher nicht bekannt. Die 3'-flankierenden Sequenzen eukaryotischer mRNA-Spezies zeigen kaum Homologie, mit Ausnahme des Hexanukleotides 5'- AAUAAA -3'. Die Sequenz ist konserviert und in der Regel liegt sie 10-30 Nukleotide von der Polyadenylierungsstelle der mRNA entfernt (Proodfoot et al., 1976). Die AAUAAA-Region ist vermutlich für die Spaltung der mRNA-Vorstufe an der Polyadenylierungsstelle von Bedeutung oder/und dient als Erkennungssignal für die Poly(A)-Polymerase. Die Termination der Transkription erfolgt nicht an der Polyadenylierungstelle, sondern weiter im 3'-Bereich des Genes.

Das SSU-Gen von Spinat und die cDNA-Sequenzen für PC, LHCP, DEL und das 34kd-Polypeptid enthalten kein Polyadenylierungssignal der Sequenz 5'- AATAAA -3'. Es existieren jedoch in allen genannten DNA-Sequenzen verwandte Hexanukleotide, die als AATAAA-Äquivalent fungieren könnten (vgl. Tabelle XIV und Abb. 41). Für das SSU-Gen von Erbse gilt die Sequenz 5'- AATGAA -3' als potentielles Polyadenylierungssignal (Coruzzi et al., 1984).

Tabelle XIV : Vergleich der potentiellen Polyadenylierungssignale des SSU-Gens und der sequenzierten cDNA-Fragmente von Spinat

Plasmid (Klon)	äquivalente Sequenz	Abstand zur pot. Polyadenylierungsstelle	Abstand zum Stoppkodon
λSonSSU (1)	5'- A A T A C A -3'	-	90 N
λSonSSU (2)	5'- A A T A A T -3'	-	127 N
pSocDEL	5'- A A T C A A -3'	13 N	-
pSocLHCP	5'- A A T A T A -3'	23 N	90 N
pSoc34kd	5'- T A T A A A -3'	7 N	83 N
pSocPC	5'- T A T A A A -3'	26 N	55 N

(N = Nukleotide)

In Tabelle XIV sind die potentiellen Polyadenylierungssignale aufgelistet, die aus den sequenzierten cDNA-Fragmenten für PC, LHCP, DEL und das 34kd-Polypeptid sowie der genomischen DNA-Sequenz für SSU entnommen werden konnten. Für das SSU-Gen können zwei potentielle Polyadenylierungssignale angegeben werden (vgl. Tabelle XIV, (1) und (2)). Da die Polyadenylierungsstelle für das SSU-Gen unbekannt ist, kann nicht entschieden werden, welches der beiden Signale das tatsächliche ist. In Abb. 41 sind Teile der nicht kodierenden, 3'-flankierenden Sequenzen des SSU-Genes und der cDNAs von PC, LHCP, DEL und des 34kd-Polypeptides wiedergegeben. Die potentiellen Polyadenylierungssignale (AATAAA-Äquivalente) sind unterstrichen. Bei der DEL-cDNA ist das funktionelle Stoppkodon unbekannt.

```
                                                                        13    8        1
pSoc34kd   TAA---- 32 ----TTTCAGCTCTTTTTGTTGTAAGGATTTCTTGAGACTCTTTAAGGAGGAACTTATAAATGATCAT AAAAA - 3'

                                                                     19    14          1
pSocDEL    ...............TATGGAATTCTGCATTTTTGAAACTATATGAACTTATATTTGTATAATCAAATTTATGACAAGC AAAAA - 3'

                                                           29    24                    1
pSocLHCP   TGA---- 55 ----TTGATGTTCTTTAATGTAAATTGGTGCAATGGATGAATATAACTAGTTTATGTGTACTAATGTG AAAAA - 3'

                                                       32    27                        1
pSocPC     TAA---- 23 ----TTATTTATATGACTTTGTTGTAGAGCTATTTATATAAACGATCTCATCAATTGGTACGTTTAGC AAAAA - 3'

                       +922  +927                            +959  +964          +978
λSonSSU    TAA---- 82 ----GGATTTTTAATACAATGGGAAAGTTGAGCTTTGTACTCTATGGGAAATAATAGCTTATCCCTAACAA... - 3'
```

Abb. 41 : Sequenzvergleich der nicht kodierenden 3'-Regionen aller sequenzierten cDNAs von Spinat und der entsprechenden genomischen DNA-Sequenz des SSU-Gens (Klon λSonSSU) von Spinat

(für den Vergleich wurden die nicht kodierenden DNA-Stränge herangezogen; sie entsprechen in ihren Sequenzen den jeweiligen mRNAs)

13 : Nukleotidposition

... : fortlaufende Sequenz

AAA : Poly(A)-Verlängerung

-32- : Abstand zwischen Stoppkodon und letztem aufgeführten Nukleotid

—— : potentielle Polyadenylierungssignale

-3' : 3'-Ende einer dargestellten Sequenz

III.K.3. Die 5'-Region des SSU-Genes von Spinat

Die nicht kodierenden 5'-Sequenzen eukaryotischer mRNA-Spezies können in ihrer Länge stark variieren (von 3 bis mehr als 700 Nukleotide). In der Regel bestehen sie aus 40-80 Nukleotiden (Kozak, 1981a). Von ähnlicher Variabilität ist auch die Nukleotidzusammensetzung, so daß selbst bei verwandten Genen, deren kodierende Sequenzen stark konserviert sind, die 5'-Sequenzen stark divergieren (Choe et al., 1982; McKeown und Firtel, 1981a). Trotz dieser Verschiedenheiten besitzen die flankierenden, nicht kodierenden 5'-Regionen eukaryotischer mRNAs folgende Gemeinsamkeiten :

1. Sie sind reich an A und T
2. Das funktionelle Initiationskodon für die Translation ist mit wenigen Ausnahmen stets AUG (Kozak, 1983).
3. Benachbarte Nukleotide der Initiationskodons sind konserviert (Kozak, 1981b).
4. Zwischen dem 5'-Ende der mRNA und dem Initiationskodon befindet sich im allgemeinen kein weiteres AUG-Triplett (Kozak, 1983).
5. Etwa 10 Nukleotide vom Initiationskodon entfernt (zum 5'-Ende der mRNA) liegt bei den mRNA-Spezies vieler niederer Eukaryoten (Hefe) die Sequenz CACACA (Dobson et al., 1982); bei den meisten höheren Eukaryoten fehlt diese Sequenz.
6. Der 5'-Terminus der mRNA ("cap site") ist teilweise konserviert (Breathnach und Chambon, 1981).

Diese genannten Charakteristika wurden bei der Analyse der entsprechenden Regionen der cDNA für SSU (vgl. III.D.5.) und des selektierten SSU-Genes berücksichtigt. Die nicht kodierende, 5'-flankierende Sequenz des cDNA-Fragmentes ist 72 Nukleotide lang und besitzt einen AT-Gehalt von etwa 68%. Der Vergleich mit dem entsprechenden Sequenzabschnitt des SSU-Genes zeigt eine erstaunliche Übereinstimmung (vgl. Abb. 42). Die Sequenzabschnitte +1 bis +59 und +70 bis +79 der genomischen DNA für SSU sind mit den entsprechenden Sequenzen im nicht kodierenden 5'-Bereich der SSU-cDNA identisch. Zwischen diesen Regionen fehlt der cDNA-Sequenz das Segment 5'- GAGTAAGT -3' (von Position +60 bis +67). Außerdem ist in Position +69 ein C/A-Austausch erfolgt.

Abb. 42 : Sequenzvergleich der nicht kodierenden 5'-Regionen der cDNA für SSU (Klon pSocSSU) und des SSU-Gens (Klon λSonSSU) von Spinat

(Darstellung der nicht kodierenden DNA-Stränge)

+1 : potentieller Startpunkt der mRNA im SSU-Gen (λSonSSU)
5'-, : 5'-Enden der dargestellten Sequenzen
-3' : 3'-Enden der dargestellten Sequenzen
* / 1 : erste Aminosäure des Transitpolypeptides
A (C) : Nukleotidaustausch
——— : Oktamer der Sequenz GAGTAAGT (fehlt in der cDNA-Sequenz)

III.K.3.1. Das Initiationskodon und seine Umgebung

Prokaryotische mRNA-Spezies besitzen im Abstand von 6-10 Nukleotiden in 5'-Richtung vom AUG-Kodon im allgemeinen die Sequenz 5'- GGAGG -3' in der nicht kodierenden 5'-Region. Dieser Abschnitt ist komplementär zur CCUCC-Sequenz (Shine und Dalgarno, 1974), die im 3'-Bereich der meisten prokaryotischen 16S rRNA-Spezies auftritt. Es wird angenommen, daß zur Translation die Bindung der 16S rRNA und damit der 30S Ribosomenuntereinheit an die mRNA über diese Sequenz erfolgt. Ein eindeutiges Äquivalent zur GGAGG-Sequenz existiert bei eukaryotischen mRNAs nicht. Bei eukaryotischen mRNAs bindet die 40S Ribosomenuntereinheit vermutlich nahe dem 5'-Terminus der mRNA, anschlie-

ßend wird die 40S Untereinheit durch die 60S Untereinheit zum 80S Ribosom komplettiert. Nach dem "Scanning-Modell" (Kozak, 1980 und 1981a) bewegt sich das Ribosom entlang der mRNA zum Initiationskodon der Translation. Da bei einigen mRNA-Spezies auch nicht funktionelle AUG-Tripletts im nicht kodierenden 5'-Bereich der mRNA exsistieren, muß das funktionelle AUG-Kodon auch durch seine Umgebung charakterisiert sein, damit es vom Ribosom als Initiationskodon erkannt werden kann. Für das Initiationskodon und seine Umgebung existiert die Konsensussequenz 5'- $\begin{matrix}A\\G\end{matrix}$NNATGG -3' (Kozak, 1981b). Das potentielle Initiationskodon des SSU-Genes und seine nähere Umgebung zeigen 100% Homologie zur Konsensussequenz nach Kozak (1981b). Zwischen dem potentiellen Initiationskodon (Position +80) und dem potentiellen Startpunkt der SSU-mRNA (Position +1) befinden sich keine weiteren ATG-Tripletts. Bis auf eine einzige Ausnahme (Position +602) zeigen alle ATG-Tripletts der Exon- und Intronbereiche des SSU-Genes mit ihrer zugehörigen Umgebung nur 60 bzw. 80% Homologie zur Konsensussequenz nach Kozak (1981b).

Die eingangs erwähnte Sequenz 5'- CACACA -3' (vgl. III.K.3.), die bei vielen niederen Eukaryoten (z.B. Hefe) vorkommt, tritt in der entsprechenden Position im SSU-Gen von Spinat erwartungsgemäß nicht auf.

III.K.3.2. Die Promotorregion des SSU-Genes von Spinat

Die Promotorregionen eukaryotischer Gene sind von besonderer Bedeutung, denn sie enthalten Initiations- und Regelelemente der Genexpression. Solche Elemente sind in eukaryotischen Promotoren zwar bekannt, aber nur unzureichend strukturell und funktionell untersucht. Das gilt besonders für die regulatorischen Elemente der Genexpression.

III.K.3.2.1. Die TATA-Region des SSU-Genes

In eukaryotischen Promotoren existiert die TATA-Region (Goldberg, 1979) als Äquivalent zur "Pribnow"-Sequenz 5'- TATAATG - 3' in prokaryotischen Promotoren (Pribnow, 1975a, 1975b und 1979). Die TATA-Region liegt im Gen etwa 25 bis 30 Nukleotide in 5'-Richtung vom Startpunkt der mRNA entfernt. Sie ist

funktionell in die exakte Lokalisation des Startpunktes der Transkription involviert und scheint unerläßlich für die in vitro Transkription von Genen, die von der Polymerase II transkribiert werden (Breathnach und Chambon, 1981).

Das SSU-Gen von Spinat besitzt zwei TATA-Sequenzen, die auch in ihrer näheren Umgebung stark homolog zur Konsensussequenz nach Breathnach und Chambon (1981) sind. Tabelle XV zeigt den Vergleich dieser Sequenz mit den TATA-Regionen des SSU-Genes von Spinat.

Tabelle XV : Vergleich der TATA-Sequenzen des SSU-Genes von Spinat mit der Konsensussequenz für TATA-Regionen nach Breathnach und Chambon (1981)

Konsensussequenz	:	5'- G N G T A T A $\frac{A}{T}$ A $\frac{A}{T}$ N G N N G - 3'
		-31 -28
TATA-Sequenz I	:	5'- T A T T A T A T A T A G A A A - 3'
		* * * * * * * *
		+24 +27
TATA-Sequenz II	:	5'- T T G T A T A A T A C T A A T - 3'
		* * * * * * *

* : Nukleotide, die mit denen der Konsensussequenz übereinstimmen
— : zentrale Nukleotide der TATA-Region
+24 : Position des Nukleotides in der DNA-Sequenz des SSU-Genes

Die TATA-Sequenz I besitzt 73% Homologie zur Konsensussequenz für TATA-Regionen nach Breathnach und Chambon (1981). Sie ist außerdem in der richtigen Distanz (Position -28 bis -31) und Orientierung zum potentiellen Startpunkt der mRNA (Position +1) lokalisiert. Die TATA-Sequenz II besitzt nur 64% Ho-

mologie zur Konsensussequenz. Ihre Lage (Position +24 bis +27) ist zudem ungewöhnlich. Eine zusätzliche TATA-Sequenz ist in vergleichbarer Position auch im LHCP-Gen von Erbse gefunden worden (Cashmore, 1984). Bei den SSU-Genen von Weizen, Erbse, Tabak und Sojabohne liegt keine TATA-Sequenz an ähnlicher Stelle.

Tabelle XVI : Vergleich der TATA-Regionen der SSU-Gene verschiedener Spezies mit der Konsensussequenz nach Morelli et al. (vgl. Text)

Konsensussequenz	:	5'- C A T T A T A T A T A G $\frac{C}{A}$ -3'	Homologie
		-32 -29	
Erbse	:	5'- C A T T A T A T A A A G C -3'	92 %
		* * * * * * * * * * * *	
		-32 -29	
Sojabohne	:	5'- T A T T A T A T A T A G C -3'	92 %
		* * * * * * * * * * * * *	
		- -	
Tabak	:	5'- C A T T A T A T A T A G G -3'	92 %
(Positionen unbekannt)		* * * * * * * * * * * * *	
		-31 -28	
Spinat	:	5'- T A T T A T A T A T A G A -3'	92 %
(TATA-Sequenz I)		* * * * * * * * * * * * *	
		+24 +27	
Spinat	:	5'- T T G T A T A A T A C T A -3'	38 %
(TATA-Sequenz II)		* * * * *	
		-36 -33	
Weizen	:	5'- G G C T A T A T A T A C C -3'	75 %
		* * * * * * * * *	

— : zentrale Nukleotide der TATA-Region

* : Nukleotide, die mit denen der Konsensussequenz übereinstimmen

+24 : Position des Nukleotides in der DNA-Sequenz des entsprechenden SSU-Gens

In Tabelle XVI sind die TATA-Regionen der SSU-Gene von Erbse (Coruzzi et al., 1984), Sojabohne (Berry-Lowe et al., 1982), Tabak (Mazur et al., 1985), Weizen (Broglie et al., 1983) und Spinat (vorliegende Arbeit) im Vergleich mit der Konsensussequenz nach Morelli et al. (1985) wiedergegeben. Die Konsensussequenz nach Morelli et al. (1985) war vornehmlich aus dem Vergleich der TATA-Regionen verschiedener SSU-Gene von Pisum sativum abgeleitet worden. Die Homologie zwischen den TATA-Regionen der dikotylen Spezies Erbse, Sojabohne, Tabak und Spinat (TATA-Sequenz I) und der Konsensussequenz nach Morelli et al. beträgt 92%. Zum monokotylen Weizen reduziert sich die Homologie auf 75%. Bei allen genannten Spezies sind in den TATA-Regionen der SSU-Gene neben der zentralen Sequenz TATA auch die flankierenden Sequenzbereiche stark konserviert. Nur bei der zusätzlichen TATA-Sequenz II von Spinat beschränkt sich die Homologie zur Konsensussequenz auf das zentrale Segment TATA (die Homologie beträgt nur ca. 38%).

III.K.3.2.2. Sequenzen zwischen den Nukleotiden -70 und -90

Während die TATA-Region für die Spezifität der Transkription mitverantwortlich ist, liegen in 5'-Richtung von der TATA-Sequenz solche Elemente, die in die Regulation der Genexpression involviert sind. Bei zahlreichen zellulären, tierischen und verschiedenen viralen Proteingenen wurden zwischen Position -70 und -80 homologe Regionen mit der Sequenz 5'- GG$\overset{C}{T}$CAATCT -3' gefunden (Breathnach und Chambon, 1981). Die Funktion dieser CAAT-Region ist nicht eindeutig bekannt. Ihre Bedeutung ist vermutlich im Zusammenhang mit der Transkriptionsquantität zu suchen.

Im SSU-Gen von Spinat treten zwei Sequenzen auf, die mit der CAAT-Region verglichen werden können. Die erste Sequenz reicht von Nukleotid -78 bis -81. Die zweite schließt sich von Position -85 bis -88 an. In Tabelle XVII ist die Konsensussequenz der CAAT-Region (Breathnach und Chambon, 1981) mit den entsprechenden Sequenzen von SSU-Genen aus Spinat (vorliegende Arbeit), Erbse (Coruzzi et al., 1984), Weizen (Broglie et al., 1983), Tabak (Mazur et al., 1985) und Sojabohne (Berry-Lowe et al., 1982) vergleichend dargestellt. Der Sequenzvergleich in Tabelle XVII zeigt deutlich, daß die zentralen Nukleotide der CAAT-Region nicht nur bei Spinat, sondern auch bei Erbse und Weizen nicht gänzlich konserviert sind. Nur die zentralen Nukleotide der CAAT-Region von Tabak und Sojabohne sind mit denen der Konsensussequenz identisch.

Tabelle XVII : Vergleich der Konsensussequenz für CAAT-Regionen nach Breathnach und Chambon (1981) mit den entsprechenden Sequenzabschnitten der SSU-Gene aus Spinat, Erbse, Sojabohne, Weizen und Tabak

Konsensussequenz	:	5'- G G $\frac{C}{T}$ C A A T C T - 3'	Homologie
		-81 -78	
Spinat (CAAT-Sequenz I)	:	5'- G G C T A A G A T - 3'	67 %
		* * * * * *	
		-88 -85	
Spinat (CAAT-Sequenz II)	:	5'- A A C C A A C G G - 3'	45 %
		* * * *	
		-84 -81	
Sojabohne	:	5'- A A C C A A T C C - 3'	67 %
		* * * * * *	
		- -	
Tabak	:	5'- A T C C A A T G G - 3'	56 %
		* * * * *	
		-83 -80	
Erbse	:	5'- G G C C A A C T A - 3'	67 %
		* * * * * *	
		-65 -62	
Weizen	:	5'- T C C C A A C C A - 3'	56 %
		* * * * *	

* : Nukleotide, die mit denen der Konsensussequenz übereinstimmen

— : zentrale Nukleotide der CAAT-Region

-81 : Position des Nukleotides in der DNA-Sequenz des jeweiligen SSU-Genes (bei Tabak sind die Nukleotidpositionen nicht genau bekannt)

III.K.3.2.3. Potentielle "Enhancer"-Elemente des SSU-Genes

"Enhancer" sind regulatorische DNA-Elemente in viralen und eukaryotischen Genomen. Sie besitzen in der Regel eine Länge von etwa 200 bp und verstärken die Transkription der Gene, mit denen sie funktionell verknüpft sind. Der Einfluß eines "Enhancers" ist dabei unabhängig von seiner Position und Orientierung, d.h. er kann in 5'- oder 3'-Richtung vom Gen lokalisiert sein. Darüberhinaus kann er über sehr große Entfernungen (mehr als 1000 bp) die Transkription eines Genes beeinflussen. "Enhancer" wurden bisher vornehmlich bei viralen Genen (Banerji et al., 1981; de Villers und Schaffner, 1981; Lusky et al., 1983; Lang et al., 1984; Laimins et al., 1982; Luciw et al., 1983) und tierischen Genen (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983 & 1984; Picard und Schaffner, 1984; Walker et al., 1983) gefunden. Aus dem Vergleich verschiedener "Enhancer"-Sequenzen wurde die Konsensussequenz 5'- GTGG$^{AAA}_{TTT}$G -3' bzw. 5'- C$^{TTT}_{AAA}$CCAC -3' abgeleitet (Weiher et al., 1983; Gillies et al., 1983).

Das SSU-Gen von Spinat enthält keine Sequenzen, die mit den genannten Konsensussequenzen identisch sind. Allerdings findet man im flankierenden 5'-Bereich sowie in geringerer Zahl auch in Intron- und flankierenden 3'-Bereichen des SSU-Genes von Spinat zahlreiche DNA-Segmente, die zu den Konsensussequenzen stark homolog sind. In Tabelle XVIII sind solche DNA-Segmente vergleichend dargestellt. Die aufgeführten Sequenzen entstammen alle dem nicht kodierenden 5'-Bereich des SSU-Genes. Außerdem wurden nur DNA-Segmente ausgewählt, die entweder mit einer der Konsensussequenzen (s.o.) zu mindestens 75% homolog sind oder aber das Element GTGG bzw. CCAC mit der entsprechenden Konsensussequenz gemeinsam haben.
In Abb. 43 sind die essentiellen "Enhancer"-Sequenzen des Immunglobulingenes C_μ (Gillies et al., 1983) und die genannten Konsensussequenzen (Weiher et al., 1983) im Vergleich mit möglichen "Enhancer"-Sequenzen des SSU-Genes von Spinat (SSU1, SSU2 und SSU3) und des SSU-Genes von Erbse (SSUE; Coruzzi et al., 1984) dargestellt. Dabei wurden die DNA-Segmente der SSU-Gene von Spinat und Erbse derartig zu den "Enhancer"-Sequenzen des Immunglobulingenes angeordnet, daß die Sequenzhomologie möglichst groß ist und die Charakteristika des IgC_μ-"Enhancers" auch in den SSU-Sequenzen zutage treten (siehe Diskussion). Die aufgeführten Sequenzen der SSU-Gene von Spinat und Erbse stammen ausschließlich aus den flankierenden, nicht kodierenden 5'-Bereichen der Gene.

Tabelle XVIII : Vergleich der möglichen "Enhancer"-Sequenzen des SSU-Genes von Spinat mit den Konsensussequenzen für "Enhancer"-Elemente nach Weiher et al. (1983)

Konsensusseq. : 5'- C (A/T)(A/T)(A/T) C C A C - 3' bzw. 5'- G T G G (T/A)(T/A)(T/A) G - 3'

SSU-Sequenzen :

-63 -56 5'- A T A T C C A C - 3' * * * * * * *	+49 +56 5'- G A G G A G T G - 3' * * * * *
-93 -86 5'- A A A A C C A A - 3' * * * * * *	-113 -106 5'- G T G T A A T G - 3' * * * * * * *
-153 -146 5'- A A T T C C T C - 3' * * * * * *	-125 -118 5'- G T G G T C G C - 3' * * * * *
-200 -193 5'- A T T T C C A T - 3' * * * * * *	-207 -200 5'- G T G C T T A A - 3' * * * * * *
-216 -209 5'- C T A T C C A T - 3' * * * * * * *	-223 -216 5'- G T G G T A C C - 3' * * * * * *
-231 -224 5'- T C T T C C A C - 3' * * * * * *	
-293 -286 5'- T T C A C C A C - 3' * * * * * *	

* : Nukleotide, die mit denen der Konsensussequenz übereinstimmen

-63 : Position des Nukleotides in der DNA-Sequenz des SSU-Genes

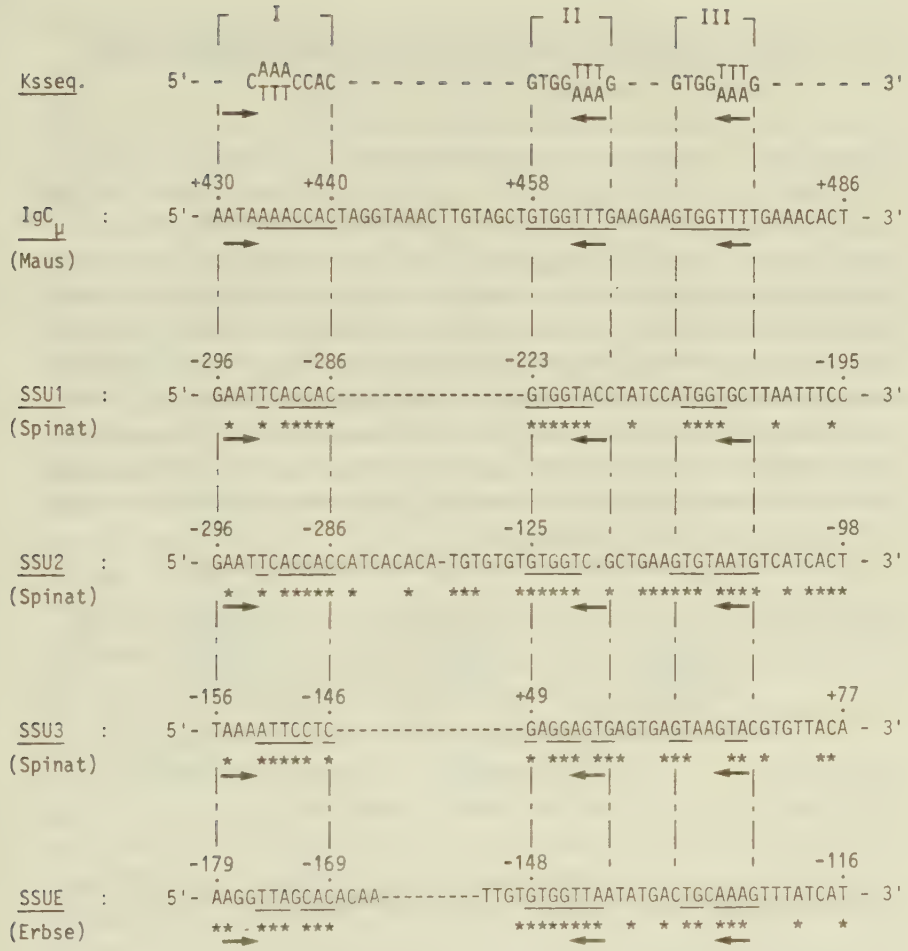


Abb. 43 : Vergleich des IgC_μ-"Enhancers" (Maus) mit ähnlichen Segmenten der SSU-Gene von Spinat (SSU1, SSU2, SSU3) und Erbse (SSUE)

$C^{AAA}_{TTT}CCAC$ und $GTGG^{TTT}_{AAA}G$ Konsensussequenzen (Weiher et al., 1983)

→ ← : Orientierungen der Segmentbereiche I-III

I-III : charakteristische Segmentbereiche (siehe Diskussion)

——— : Nukleotide, die mit denen der Konsensussequenzen übereinstimmen

* : Nukleotide, die mit denen der IgC_μ-Sequenz bzw. der Konsensussequenzen übereinstimmen.

-125 : Nukleotidposition im zugehörigen Gen

III.L. Hybridisierung von cDNA- und nukleären DNA-Fragmenten gegen HindIII-restringierte Kern-DNA von Spinat

Die getrimmten, ^{32}P-markierten cDNA-Fragmente für LHCP (Klon pSocLHCP), PC (Klon pSocPC) und DEL (Klon pSocDEL) sowie genomische DNA-Fragmente des SSU-Genes (Subfragmente des Klons λSonSSU) wurden gegen HindIII-restringierte nukleäre DNA von Spinat hybridisiert. Die G- und C-Polymere an den Enden der cDNA-Fragmente mußten entfernt werden, da erste Experimente gezeigt hatten, daß die Homopolymere mit offenbar repetitiven Sequenzen der nukleären DNA hybridisierten. Die SSU-Hybridisationsprobe bestand aus den beiden genomischen DNA-Fragmenten EcoRI/EcoRI (0,8 kb) und EcoRI/HindII (0,5 kb) (s.u.). Die Ergebnisse der Hybridisierung für die cDNA-Fragmente für LHCP, PC und DEL sind in Abb. 44 wiedergegeben und auch in Tabelle XIX zusammengefaßt. In der Tabelle sind ebenfalls die zur Trimmung der einzelnen cDNA-Fragmente eingesetzten Restriktionsenzyme aufgeführt.

Tabelle XIX : Zusammenfassung der Ergebnisse zur Hybridisierung der cDNA-Fragmente für LHCP, PC und DEL sowie der nukleären DNA-Fragmente für SSU gegen HindIII-restringierte Kern-DNA von Spinat.

DNA-Sonde	Restriktionsenzyme	Hybridisationssignale in kb		
EcoRI/EcoRI (0,8 kb)		20,0	15,0	13,0
+		11,5	9,6	8,6
EcoRI/HindII (0,5 kb)		7,5	6,4	5,8
		5,0	4,3	3,8
LHCP-cDNA	EcoRI/HindIII	8,6	6,8	
PC-cDNA	Sau3A/HinfI	22.0	12,5	
DEL-cDNA	EcoRI/Sau3A	9,9		

Das EcoRI/EcoRI-Fragment ist mit dem EcoRI-Subfragment B des genomischen SSU-Klons λSonSSU identisch (vgl. III.K.). Das Fragment enthält kodierende Sequen-

zen für das Transitpolypeptid und das Strukturpolypeptid der SSU sowie nicht kodierende Sequenzen aus dem 5'-Bereich des Genes. Das EcoRI/HindII-Fragment ist ein Restriktionsprodukt des EcoRI-Subfragmentes C des SSU-Klons λSonSSU (vgl. III.K.). Dieses Fragment enthält kodierende Sequenzen für das Strukturpolypeptid von SSU sowie nicht kodierende Sequenzen aus dem 3'-Bereich des Genes.

Vergleichende Hybridisierungen von cDNA-Fragmenten für die SSU gegen restringierte, nukleäre DNA von Petunia (Dunsmuir et al., 1983) haben gezeigt, daß die Komplexität der Hybridisationssignale durch die Hybridisierungsbedingungen und die cDNA-Sequenz bestimmt ist. Bei Petunia wurden vier verschiedene cDNA-Fragmente für die SSU als Hybridisationsproben verwendet. Sie enthielten fast ausschließlich kodierende Sequenzen, stellten aber cDNA-Transkripte verschiedener mRNA-Spezies der SSU dar. Unter den üblichen Hybridisationsbedingungen (50% Formamid, 4xSSC, 42°C) und den gleichen Waschungsbedingungen waren die Signalmuster für alle cDNA-Sonden identisch (12-14 Signale). Wurden hingegen stringentere Hybridisations- und Waschungsbedingungen gewählt (50% Formamid, 4xSSC, 55°C), so zeigte sich für jede der vier cDNA-Sonden ein individuelles Muster (1-3 Signale). Daraus folgte, daß im Genom von Petunia mehrere verschiedene SSU-Gene als Genfamilie exsistieren. Genfamilien für die SSU wurden auch bei Weizen (Broglie et al., 1983), Sojabohne (Berry-Lowe et al., 1982) und Erbse (Coruzzi et al., 1983) nachgewiesen.

Für die Hybridisierung der cDNA-Fragmente für LHCP, PC und DEL gegen die restringierte Kern-DNA (HindIII) von Spinat wurden vergleichbar stringente Bedingungen verwendet (vgl. II.L.3.) wie bei Petunia (Dunsmuir et al., 1983), um einzelne Mitglieder möglicher Genfamilien für LHCP, PC und DEL zu sondieren. Das cDNA-Fragment für das Chlorophyll a/b-bindende Polypeptid (LHCP) enthält ausschließlich kodierende Sequenzen. Es hybridisiert mit zwei nukleären HindIII-Fragmenten von 8,6 und 6,8 kb (Abb. 44, Bahn 2). Sie repräsentieren entweder ein oder zwei LHCP-Gene. Ähnlich sind die Ergebnisse bei dem cDNA-Fragment für Plastocyanin, das ebenfalls überwiegend kodierende Sequenzen enthält. Auch hier entstehen zwei Hybridisationssignale bei 22,0 und 12,5 kb, die die Exsistenz von wenigstens ein oder zwei PC-Genen anzeigen (Bahn 3). Das cDNA-Fragment für die CF_1-Untereinheit Delta zeigt nur ein Hybridisationssignal bei 9,9 kb (vgl. Bahn 4). Dieses Ergebnis ist verständlich, da das cDNA-Fragment überwiegend aus nicht kodierenden Sequenzen besteht (vgl. III.D.2.).

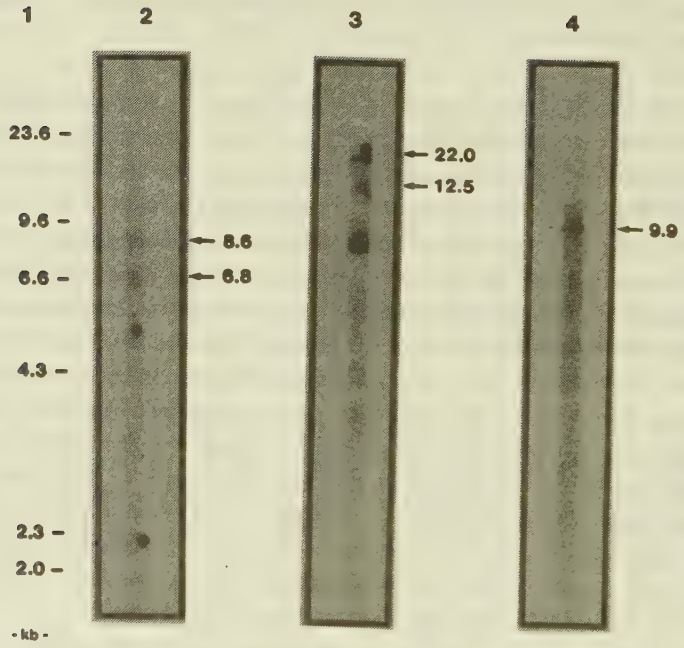


Abb. 44 : Ergebnis zur Hybridisierung der cDNA-Fragmente für LHCP, PC und DEL gegen HindIII-restringierte Kern-DNA von Spinat (Autoradiographie)

(Kern-DNA von Spinat wurde mit HindIII restringiert, über ein 0,5%-iges Agarosegel pherographiert, auf Nitrozellulose transferiert und mit ^{32}P-markierten DNA-Fragmenten hybridisiert)

Hybridisierung mit :
- Längenstandard (Lambda/HindIII) (1)
- cDNA-Fragment für LHCP/ Klon pSocLHCP (2)
- cDNA-Fragment für PC / Klon pSocPC (3)
- cDNA-Fragment für DEL / Klon pSocSSU (4)

Vergleichende Untersuchungen an mRNAs einer Polypeptidspezies haben gezeigt, daß die nicht kodierenden mRNA-Sequenzen kaum konserviert sind (siehe Diskussion). Für die Hybridisierung der genomischen SSU-Fragmente gegen HindIII-restringierte Kern-DNA von Spinat wurden weniger stringente Bedingungen gewählt als bei der Hybridisierung mit den cDNA-Fragmenten für PC, DEL und LHCP. Die Hybridisierungs- und Waschungsbedingungen entsprachen für die genomischen SSU-Fragmente den Bedingungen von Dunsmuir et al. (1983) bei Petunia (50% Formamid, 4xSSC oder 4xSSPE, 42°C). Hierdurch sollten möglichst alle Mitglieder der SSU-Genfamilie sondiert werden. Es entstanden insgesamt 12 Signale von 3,8 bis 20,0 kb (vgl. Tabelle XIX). Die Ergebnisse zeigen, daß auch bei Spinat mehrere SSU-Gene exsistieren, die im Genom an verschiedenen Stellen lokalisiert sind.

IV. DISKUSSION

Die Kooperation der genetischen Kompartimente Kern/Cytoplasma und Plastide ist essentiell für die Biogenese und die Funktion der Plastide. Viele, wenn nicht alle multimeren Strukturen des Chloroplasten sind genetisch dualen Ursprungs, d.h. plastidäre und nukleäre Genprodukte sind substanziell am Aufbau der multimeren Strukturen beteiligt. Das gilt besonders für die vier supramolekularen Multiproteinkomplexe der Thylakoidmembran (siehe Einleitung), die räumlich benachbart und funktionell miteinander verknüpft sind. Von den etwa 45 Polypeptiden, die am Aufbau der Multiproteinkomplexe beteiligt sind, ist der Kodierungsort bei ca. 30 Polypeptiden bekannt, die etwa zur Hälfte genetisch dem Plastom bzw. dem Genom entstammen. Die Mechanismen, die das Zusammenspiel zwischen diesen genetischen Kompartimenten zeitlich und stöchiometrisch regulieren und dabei koordinieren, sind bis heute jedoch nicht bekannt. Ihre Aufklärung setzt umfangreiche Kenntnisse hinsichtlich der Struktur, Organisation und Expression der beteiligten nukleären und plastidären Gene voraus. Die Komplexität des Genoms erschwert jedoch die Isolation nukleärer Gene und macht, verglichen mit der Isolation plastidärer Gene, methodische Umwege notwendig, die langwierig sowie technisch schwierig sind und von zahlreichen Unwägbarkeiten begleitet werden. Obwohl sich etliche Forschungsgruppen seit der Isolation der ersten cDNA für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase (Bedbrook et al., 1980) um die Selektion weiterer DNA-Sequenzen bemühen, die für Proteine der Photosynthesereaktionen, insbesondere der Lichtreaktion kodieren, wurden mit Ausnahme der cDNA und der genomischen DNA für das Chlorophyll a/b-bindende Polypeptid des Antennenkomplexes vom Photosystem II (Coruzzi et al., 1983; Cashmore, 1984) keine Sequenzen publiziert, die für cytoplasmatische Untereinheiten der Thylakoidmembran kodieren. Trotz aller Schwierigkeiten gelang in unserem Labor, im Rahmen dieser Arbeit und zweier Diplomarbeiten (Jansen, 1985; Rother, 1985) die Isolation fünf verschiedener cDNA-Sequenzen und drei verschiedener nukleärer Gene für Polypeptide der Thylakoidmembran bzw. der photosynthetischen Dunkelreaktion.

Die enzymatische Umwandlung von polyadenylierter mRNA (Poly(A)$^+$-RNA) in doppelsträngige cDNA (dscDNA) und ihre Insertion in Plasmid- oder Lambda-Vektoren gehört zu dem weitreichensten Methoden eukaryotischer Molekularbiologie der letzten Jahre. Die cDNA-Synthese ermöglicht die Isolation einzelner Gensequenzen selbst niedrigster Abundanz, was von besonderem Interesse ist, da die meisten mRNA-Spezies einer typischen Eukaryotenzelle nur in geringer Kopienzahl vorliegen (Williams et al., 1979). Da im allgemeinen nicht nur die Struktur der

mRNA, sondern auch die molekulare Organisation des zugehörigen Gens von Interesse ist, wird eine cDNA-Klonbank meist in Verbindung mit einer genomischen Klonbank erstellt. Die cDNA-Klonbank liefert dabei die Sequenzen, mittels derer einzelne Gene aus einer solchen Bank isoliert werden können. Darüber hinaus läßt die cDNA-Sequenz Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz des entsprechenden Polypeptides und die nicht kodierenden, transkribierten 5'- und 3'-Regionen der mRNA zu. Auch können durch Hybridisierung der cDNA gegen die entsprechenden genomischen Sequenzen die Positionen von Introns und Exons, sofern vorhanden, exakt kartiert werden (Berk und Sharp, 1977).

Die ersten Synthesen einzelsträngiger cDNA wurden durch Baltimore (1970) sowie Temin und Mizutani (1970) mit der Reversen Transkriptase aus Hühnermyoblasten durchgeführt. Die erste gelungene cDNA-Klonierung (als mRNA/cDNA-Hybrid) geht auf Wood und Lee (1976) zurück. Seither sind eine Reihe von Methoden zur cDNA-Synthese und -Klonierung entwickelt worden, die in einigen Teilschritten variieren, sich jedoch prinzipiell nur wenig unterscheiden. Allen gemeinsam ist die Synthese einzelsträngiger cDNA (sscDNA) durch die Reverse Transkriptase, der die alkalische Hydrolyse der mRNA-Matrize folgt. Für die Synthese der doppelsträngigen cDNA existieren diverse Möglichkeiten hinsichtlich der Initiation und Katalyse der Synthese. Die Synthese der dscDNA kann sowohl durch die Reverse Transkriptase (Pougeon und Mach, 1976; Pougeon und Mach, 1977; Ullrich et al., 1977), als auch die DNA-Polymerase I (Maniatis et al., 1976; Efstratiadis et al., 1976), das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Rougeon und Mach, 1976) oder die T4 DNA-Polymerase (Williams und Lloyd, 1979) durchgeführt werden. Mit Ausnahme der Reversen Transkriptase stammen alle genannten Enzyme aus E.coli. Die Insertion der doppelsträngigen cDNA erfolgt via Linker (Heynecker et al., 1976) oder GC- (AT)-Homopolymere (Jackson et al., 1972; Wensink et al., 1974; Pougeon et al., 1975; Land et al., 1981) in Plasmid-Vektoren, z.B. pBR322 (Bolivar et al., 1977) und pAT153 (Twigg und Sherrat, 1980) oder Lambda gt-Vektoren (Young und Davis, 1983 sowie Huynh et al., 1984). Auch die Insertion doppelsträngiger cDNA mit glatten Enden in entsprechend präpariertes Plasmid ist schon mit Erfolg durchgeführt worden (Cochet et al., 1979). Hierdurch läßt sich das Klonierungsverfahren erheblich abkürzen, jedoch existieren dazu keine Daten bezüglich der Klonierungseffizienz. Im allgemeinen sinkt die Ausbeute an Transformanden bei der Klonierung mit glatten Enden um ca. eine Potenz.

Die bis heute existierenden Methoden zur Synthese und Klonierung von cDNA sind nicht als gleichwertige Alternativen zu betrachten, sondern enthalten vielmehr Unterschiede, die zu qualitativ ungleichen Klonbanken führen. Keine der Methoden genügt allen erwünschten Ansprüchen, so daß durch die Wahl der Methode auch ihre Grenzen berücksichtigt und in Kauf genommen werden müssen. Somit ist vor der Erstellung der cDNA-Klonbank zunächst die Frage zu klären, welches Ziel man durch die Klonbank zu erreichen sucht und ob nicht die Erstellung mehrerer cDNA-Klonbanken nach verschiedenen Gesichtspunkten sinnvoll ist. Deshalb wurden von mir cDNA-Klonbanken von Spinat nach zwei verschiedenen Methoden erstellt. Die angewandten Verfahren unterscheiden sich vornehmlich in ihren Bedingungen bei der Synthese des zweiten cDNA-Stranges, den Klonierungsvektoren und den Modalitäten bei der Insertion der cDNA-Fragmente in den Vektor. Die beiden Verfahren werden in der folgenden Diskussion "Linker-Methode" bzw. "Homopolymer-Methode" genannt. Die Bezeichnungen kennzeichnen die Art und Weise der cDNA-Insertion in den jeweiligen Klonierungsvektor. Alle isolierten cDNA-Fragmente, die in dieser Arbeit beschrieben werden, stammen aus den cDNA-Klonbanken, die nach der "Homopolymer-Methode" erstellt wurden. Die nach der "Linker-Methode" erstellte cDNA-Klonbank wurde zunächst nur auf ihre Qualität überprüft (vgl. Ergebnisteil); ihre Analyse erfolgt gegenwärtig.

Für beide cDNA-Klonbanken wurde als Ausgangsmaterial Poly(A)$^+$-RNA aus Spinat verwendet, die durch LiCl-Fällung und Oligo(dT)-Zellulose gereinigt und angereichert worden war. Die Synthese der einzelsträngigen cDNA (sscDNA) verlief bei beiden Methoden, wenn man von den unterschiedlichen Ausbeuten an sscDNA absieht (vgl. III.A.2. und III.B.), relativ einheitlich. In beiden Reaktionen wurde die Synthese durch die Reverse Transkriptase katalysiert und die mRNA-Matrize wurde nach der Synthese stets durch eine alkalische Hydrolyse entfernt. Dieser erste Schritt der cDNA-Synthese ist auch gleichzeitig der entscheidende, denn schon hier werden der Umfang und die Qualität der cDNA-Klonbank festgelegt. Die Effizienz der Transkription ist sowohl mit der Qualität der Reversen Transkriptase und den geeigneten Reaktionsbedingungen, als auch mit der Qualität der Poly(A)$^+$-RNA eng verknüpft. Unter der Qualität der Poly(A)$^+$-RNA ist ihre Intaktheit und Reinheit zu verstehen. Beide Parameter können durch die in vitro Translation im zellfreien Kaninchen-Retikulocytenlysat annähernd überprüft werden (vgl. III.A.1.). Dabei lieferten 0,01 µg Poly(A)$^+$-RNA (10% eines Translationsansatzes) nach einer Expositionszeit von etwa 2 Tagen ein komplexes Translationsmuster mit Polypeptiden zwischen 10 und mehr als 80 kd.

Im Gegensatz zur Synthese des ersten cDNA-Stranges sind bei der Synthese des zweiten cDNA-Stranges einige methodische Varianten möglich, die zu qualitativ verschiedenen cDNA-Klonbanken führen können. Bei der "Homopolymer-Methode" wurde die sscDNA an ihrem 3'-Ende durch die Addition von dCMP verlängert (Terminaltransferasereaktion), um nach der Zugabe von Oligo(dG) ein doppelsträngiges DNA-Segment zu erzeugen, das die Initiation der Synthese des zweiten cDNA-Stranges ermöglicht (Rougeon et al., 1975). Als Alternative wurde bei der "Linker-Methode" die Schleifenstruktur am 3'-Ende einzelsträngiger cDNAs zur Initiation der dscDNA-Synthese genutzt. Die Schleifenstruktur kommt dadurch zustande, daß sich komplementäre Sequenzen des 3'-Endes einer sscDNA miteinander paaren. Dabei entsteht ein doppelsträngiges Segment mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe, so daß hier die Synthese des zweiten Stranges initiiert werden kann (Englund, 1971; Rougeon und Mach, 1976; Pavlakis et al., 1980). Es ist nicht bekannt, ob solche Schleifenstrukturen an den 5'-Enden von mRNAs *in vivo* funktionelle Bedeutung besitzen. Einige Autoren vermuten, daß sie einen universellen Charakter besitzen und diese Region der mRNAs für die Initiation der *in vivo* Proteinsynthese von Bedeutung ist. Für diese Annahme existieren jedoch bis heute keine eindeutigen Beweise. Nach Untersuchungen von Rougeon und Mach (1976) treten solche Schleifenstrukturen eher bei "Vollängen-sscDNAs", als bei Abbruchprodukten der Synthese des ersten cDNA-Stranges auf. Dieser Befund ist leicht zu erklären, denn die nicht kodierenden 5'-Regionen von mRNAs (3'-Regionen der sscDNAs) enthalten zahlreiche A- und T-Oligomere, die intramolekulare Hybride bilden können. Verwendet man dieses DNA/DNA-Hybrid als Initiationssegment bei der Synthese des zweiten cDNA-Stranges, so muß der dscDNA-Synthese eine S_1-Nukleasebehandlung folgen. Durch die S_1-Restriktion wird die Schleifenstruktur am Ende der dscDNA beseitigt, und es entstehen überwiegend dscDNA-Fragmente mit glatten Enden. Teilweise entstehen aber auch solche DNA-Fragmente, die 5'-überhängende, einzelsträngige Enden besitzen. Diese Einzelstränge können durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zum Doppelstrang ergänzt werden. Die Verwendung der S_1-Nuklease hat zur Folge, daß DNA-Sequenzen unbekannter Größe verlorengehen, die dem 5'-Bereich der mRNA homolog sind (Maniatis et al., 1976; Efstratiadis et al., 1977). Außerdem ist keineswegs gewährleistet, daß alle sscDNAs (selbst "Vollängen-sscDNAs") solche endständigen Schleifenstrukturen ausbilden. Rougeon und Mach (1976) haben gefunden, daß die Synthese des zweiten cDNA-Stranges für das Immunglobulin der Maus nur mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, nicht aber mit der Reversen Transkriptase durchführbar ist. Sie führten diesen Unterschied darauf zu-

rück, daß die sscDNA des Immunglobulins die endständige Schleifenstruktur wohl nicht natürlicherweise besitzt. Da die Synthese der dscDNA in Gegenwart des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I dennoch stattfindet, vermuten die Autoren Rougeon und Mach, daß das Enzym mit seiner 3'→5' Exonukleaseaktivität die sscDNA von ihrem 3'-Ende aus degradiert, bis eine endständige DNA-Sequenz entsteht, die in ihrer Nachbarschaft eine komplementäre Sequenz vorfindet, so daß die Schleifenstruktur ausgebildet werden kann. Im Unterschied zum Klenow-Fragment besitzt die Reverse Transkriptase keinerlei Exodesoxyribonukleaseaktivitäten (nur Exoribonukleaseaktivitäten), so daß die Reverse Transkriptase die sscDNA nicht in der beschriebenen Weise degradieren kann. Das heißt, die Reverse Transkriptase kann nur solche sscDNAs als Matrize benutzen, die natürlicherweise eine 3'-terminale Schleifenstruktur ausbilden. Die Verwendung der S_1-Nuklease ist mit einem zusätzlichen Problem behaftet, denn selbst unter niedrigen Temperaturen beginnen AT-reiche Regionen der dscDNA zu schmelzen. Sie sind dann potentielle Spaltstellen für die S_1-Nuklease. Hierbei sind besonders die nicht kodierenden 3'- und 5'-Regionen der dscDNA betroffen, denn in diesen Bereichen ist der AT-Gehalt besonders hoch. Für die "Homopolymer-Methode" existiert das dargestellte Problemspektrum nicht. Allerdings ist hier bei den Terminaltransferasereaktionen darauf zu achten, daß die 3'-terminalen Elongationen der sscDNA und der dscDNA sich auf ca. 10-20 Nukleotide pro 3'-Ende beschränken, denn lange C- und G-Homopolymere beeinträchtigen die Transformationsrate (Nelson und Brutlag, 1979). Dieses Problem läßt sich jedoch durch die geeignete Abstimmung der Reaktionsbedingungen für die Terminaltransferase weitgehend beseitigen.

Bei der "Homopolymer-Methode" folgen nach der Synthese des zweiten cDNA-Stranges noch vier Reaktionen bis zur Transformation (vgl. III.A.2.), von denen zwei durch die Terminaltransferase katalysiert werden. Die letzte Reaktion, die Insertion der dscDNA in den Plasmid-Vektor, verläuft nicht enzymatisch. In den beiden Terminaltransferasereaktionen werden die dscDNA um oligo(dC) und der PstI-linearisierte Vektor (pBR322) um oligo(dG) 3'-terminal verlängert. Die Elongationen sollten 10-20 Nukleotide nicht überschreiten. Die dscDNA kann dann durch die Paarung ihrer C-Homopolymere mit den G-Homopolymeren des Vektors inseriert werden (Lobban und Kaiser, 1973; Jackson et al., 1972; Wensink et al., 1974). Die rekombinanten Moleküle sind bei 37°C stabil (Nelson und Brutlag, 1979). Die formierten GC-Paarungen sind meist nicht perfekt, d.h. die

rekombinanten Moleküle enthalten auch kurze, einzelsträngige Abschnitte. Diese einzelsträngigen Bereiche werden jedoch nach der Transformation durch Enzyme der Bakterienzelle repariert, so daß stabile, geschlossene DNA-Zirkel entstehen (Wensink et al., 1974). Im allgemeinen kann eine cDNA, die nach der "Homopolymer-Methode" in einen Vektor inseriert wurde, nicht enzymatisch exzisiert werden. Nur wenn der Vektor für die cDNA-Insertion mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert wurde, kann das cDNA-Fragment später mit der gleichen Restriktionsendonuklease wieder komplett ausgeschnitten werden. Als geeignete Restriktionsenzyme gelten z.B. PstI und KpnI, deren Erkennungssequenzen an den Schnittstellen mit G (PstI) bzw. C (KpnI) eingeleitet werden. Der Vektor muß dementsprechend mit G- oder C-Oligomeren 3'-terminal verlängert werden, wohingegen die dscDNA die komplementären C- bzw. G-Oligomere endständig aufweisen muß (vgl. Abb. 3).

Einen alternativen Weg für die Insertion der dscDNA in den Vektor bietet die "Linker-Methode", die jedoch wesentlich komplexer als die "Homopolymer-Methode" ist. Hierzu muß die dscDNA zunächst mit S_1-Nuklease behandelt werden, um glatte DNA-Enden zu erzeugen. Die Nachbehandlung der S_1-restringierten dscDNA mit dem Klenow-Fragment ist obligatorisch, denn erst dann können die Linkermoleküle mit den dscDNAs enzymatisch verknüpft werden (Heynecker et al., 1976). Die Effizienz dieser Ligation ist im allgemeinen nur gering, so daß nur ein geringer Anteil der dscDNA-Fragmente mit Linkermolekülen versehen ist. Die Ligationseffizienz kann jedoch wesentlich verbessert werden, indem man mit einem hohen Überschuß an Linkermolekülen arbeitet. Da Linkermoleküle doppelsträngige DNA-Segmente sind, müssen sie mit dem entsprechenden Enzym nachrestringiert werden, bevor die dscDNA in den Vektor inseriert werden kann (z.B. EcoRI-Linker mit dem Restriktionsenzym EcoRI). Um zu verhindern, daß das Restriktionsenzym auch die dscDNA restringiert, müssen entsprechende Schnittstellen auf der DNA vor der Ligation der Linkermoleküle mit der dscDNA durch Methylierung geschützt werden (Maniatis et al., 1978). Darüber hinaus sollte die linearisierte Vektor-DNA vor der Insertion der dscDNA mit Phosphatase behandelt werden (Seeberg et al., 1977; Ullrich et al., 1977). Dadurch wird die intramolekulare Zirkularisation des Vektors bei der Ligation mit der dscDNA reduziert. Eine solche Maßnahme ist bei der Insertion der dscDNA via GC-Paarung nicht notwendig, da infolge identischer Endsequenzen (G-Homopolymere) die Vektor-DNA ohnehin nicht intramolekular zirkularisieren kann. Es ist leicht einzusehen, daß die "Linker-Metho-

de" mit ihren zahlreichen Reaktionsschritten größere methodische Probleme mit sich bringen kann als die "Homopolymer-Methode". Andererseits bietet nur die "Linker-Methode" die Möglichkeit unter den verfügbaren Klonierungsvektoren relativ frei zu wählen, so daß die Sichtung einer cDNA-Klonbank mit verschiedenen Methoden und nach unterschiedlichen Kriterien erfolgen kann. Ein Nachteil der "Homopolymer-Methode", der von großer praktischer Bedeutung ist, muß noch erwähnt werden. Exzisiert man klonierte cDNA-Fragmente, die durch GC-Paarung in den Klonierungsvektor inseriert wurden, so enthalten sie an ihren Enden alle GC-Sequenzen, die während der cDNA-Synthese addiert wurden, auch die des Vektors. Das ist besonders nachteilig, wenn die cDNA-Fragmente für Hybridisierungsexperimente verwendet werden sollen (siehe Ergebnisteil).

Grundsätzlich bieten sich für die Klonierung der dscDNA Plasmid- und Lambda-Vektoren an, wobei die Bandbreite geeigneter Lambda-Vektoren relativ klein ist. Für die Klonierung von dscDNAs, die nach der "Homopolymer-Methode" synthetisiert wurden, sind nur Plasmid-Vektoren geeignet. Die Selektion rekombinanter Klone ist vereinfacht, da der linearisierte und an seinen 3'-Enden mit G-Oligomeren elongierte Vektor nicht religieren kann. Folglich reicht für einen Klonierungsvektor wie pBR322 die Resistenz der Bakterienkolonien gegen Tetracyclin als Selektionsmarker in der Praxis aus. Die Sichtung einer solchen cDNA-Klonbank erfolgt im allgemeinen durch Hybridisierung und Hybridselektion. Für die dscDNAs, die nach der "Linker-Methode" synthetisiert wurden, bieten sich Plasmid- als auch Lambda-Vektoren an. Die Lambda-Klonierung ist besonders wegen ihrer hohen Klonierungseffizienz vorteilhaft. Außerdem kann eine Lambda/cDNA-Klonbank durch Hybridisierung mit homologen oder heterologen DNA-Sonden schneller gesichtet werden als eine Plasmid/cDNA-Klonbank, da Phagen wesentlich dichter plattiert werden können als Bakterien. Darüber hinaus ist die Hybridisierung gegen Phagen in geringerem Maß von Artefakten begleitet und überlagert als die Hybridisierung gegen Bakterien. Für die Klonierung der dscDNA von Spinat ("Linker-Methode") wurde deshalb der Lambda-Vektor gt11 gewählt (Young und Davis, 1983). Die Vektor-DNA trägt ein ß-Galaktosidasegen mit einer EcoRI-Klonierungsstelle, so daß EcoRI-Linker bei der Vorbereitung der dscDNA zur Klonierung eingesetzt wurden. Das ß-Galaktosidasegen des Vektors wird vom Wirtsbakterium exprimiert, so daß unter entsprechenden Substrat- und Induktionsbedingungen blaue Plaques entstehen. Phagenplaques mit rekombinanter DNA bleiben unter den gleichen Bedingungen ungefärbt. Die Ausbeute rekom-

binanter Phagen betrug 20-30%. Der Lambda-Vektor gt11 ist auch als Expressionsvektor geeignet und kann zur Erstellung einer Expressions-Klonbank verwendet werden (Young und Davis, 1983). Alternativ können dscDNAs, die nach der "Linker-Methode" synthetisiert wurden auch in Plasmiden kloniert und exprimiert werden (z.B. in den Vektoren pEX1, 2 und 3). Die Sichtung einer solchen Klonbank erfolgt dann mit Antikörpern.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, ist die Erstellung einer cDNA-Klonbank meistens als Voraussetzung anzusehen, um spezifische cDNA-Sequenzen zu isolieren, mit denen die zugehörigen nukleären Gene aus einer genomischen Klonbank selektiert werden können. Auch in der vorliegenden Arbeit stand nach der erfolgreichen Selektion und Charakterisierung spezifischer cDNA-Sequenzen die Isolation entsprechender nukleärer Gene im Mittelpunkt meines Interesses. Die Prozedur der Erstellung einer genomischen Klonbank läßt sich durch folgende essentielle Schritte charakterisieren (vgl. III.F. und Abb. 26) :

- die Präparation hochmolekularer, eukaryotischer DNA
- die enzymatische oder mechanische Fragmentierung der eukaryotischen DNA
- die Präparation und Restriktion der Vektor-DNA
- die Präparation eines effizienten in vitro Verpackungsextraktes
- die Ligation der DNA-Komponenten
- die in vitro Verpackung der rekombinanten DNA
- die Amplifizierung der Klonbank

Ähnlich wie bei der Erstellung der cDNA-Klonbank stehen zu Beginn Entscheidungen an, die die Qualität der genomischen Klonbank entscheidend mitbestimmen. Dazu gehören die Wahl des Klonierungsvektors und in Verbindung damit die Wahl des Restriktionsenzyms, mit dem die nukleäre DNA fragmentiert werden soll. Grundsätzlich stehen für die Konstruktion der genomischen Klonbank drei Vektorsysteme zur Verfügung (Bakteriophage-Lambda, Cosmid, Plasmid) mit denen bereits genomische Klonbanken für verschiedene tierische und pflanzliche Spezies erstellt wurden. Durch die Wahl des Vektorsystems und des Vektors sind dann bereits die meisten übrigen Klonierungsparameter festgelegt, z.B. die Größe der klonierbaren DNA und die Restriktionsenzyme, die für die Fragmentierung der nukleären DNA in Betracht kommen. Für die Klonierung der nukleären DNA von Spinacia oleracea wurde das Lambda-System gewählt, da es neben seiner hohen Klonierungseffi-

zienz erhebliche Vorteile bei der Selektion spezifischer DNA-Sequenzen durch Hybridisierung bietet. Lambda-Klonbanken wurden für zahlreiche Organismen, wie Drosophila melanogaster (Maniatis et al., 1978), Hefe (Struhl et al., 1976) Mensch (Lawn et al., 1978), Maus (Blattner et al.,1978) und Ratte (Sargent et al., 1979) erstellt. Der Lambda-Vektor EMBL4, der letztlich für die Klonierung der nukleären DNA von Spinat ausgewählt wurde, besitzt Klonierungsstellen für SalI-, EcoRI- und BamHI-restringierte Fremd-DNA. Da eine möglichst umfangreiche Klonbank erstellt werden sollte, wurde die Kern-DNA mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut (Sinsheimer, 1977), um möglichst viele verschiedene DNA-Fragmente eines bestimmten Molekulargewichtsbereiches (10-20 kb) zu erzeugen. Die Sau3A-restringierten DNA-Fragmente lassen sich in BamHI-restringierte EMBL4-DNA inserieren. Nur durch die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme zur Fragmentierung nukleärer DNA ist die Konstruktion einer Klonbank möglich, die die Existenz aller nukleärer Sequenzen wahrscheinlich macht. Hierzu gehören Restriktionsenzyme, die eine Erkennungssequenz von 4 Basen besitzen, wie HaeIII (Lawn et al., 1978), AluI (Lawn et al., 1978) und die Isoschizomere MboI (van Der Ploeg et al., 1980) und Sau3A. Aber auch EcoRI-restringierte nukleäre DNA (EcoRI-Erkennungssequenz besteht aus 6 Basen) wurde schon zur Erstellung einer genomischen Klonbank mit Erfolg eingesetzt (jüngst auch in unserem Labor).

Für die genomische Klonierung ist die Fraktionierung der partiell restringierten Kern-DNA aus zwei Gründen unerläßlich. Erstens kompetieren die kleineren und größeren DNA-Fragmente unfraktionierter DNA bei der Ligation mit den DNA-Fragmenten geeigneter Klonierungsgröße. Dadurch ist die Klonierungseffizienz nur gering, denn es werden nur solche Moleküle effizient in vitro verpackt und transduziert, die in ihrer Größe etwa der Lambda-DNA (75-105%) entsprechen (Feiss et al., 1977). Zweitens besteht die Gefahr, daß kleine Fragmente miteinander ligieren, dann als rekombinantes Segment in den Vektor inseriert und kloniert werden. Die Größenfraktionierung kann durch eine Agarosegelelektrophorese (Aaij und Borst, 1972) oder durch eine Zentrifugation im Saccharosegradienten erfolgen. Die restringierte DNA läßt sich über die Agarosegelelektrophorese zwar präziser fraktionieren, jedoch können lösliche Bestandteile der Agarose die DNA-Präparation kontaminieren und spätere enzymatische Reaktionen inhibieren. Daher wurde die DNA-Fraktionierung im Saccharosegradienten bevorzugt, die solche unerwünschten Nebenwirkungen ausschließt. Eine weitergehende Fraktionierung der DNA-Fragmente geeigneter Klonierungsgröße, etwa durch RPC-5

binanter Phagen betrug 20-30%. Der Lambda-Vektor gt11 ist auch als Expressionsvektor geeignet und kann zur Erstellung einer Expressions-Klonbank verwendet werden (Young und Davis, 1983). Alternativ können dscDNAs, die nach der "Linker-Methode" synthetisiert wurden auch in Plasmiden kloniert und exprimiert werden (z.B. in den Vektoren pEX1, 2 und 3). Die Sichtung einer solchen Klonbank erfolgt dann mit Antikörpern.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, ist die Erstellung einer cDNA-Klonbank meistens als Voraussetzung anzusehen, um spezifische cDNA-Sequenzen zu isolieren, mit denen die zugehörigen nukleären Gene aus einer genomischen Klonbank selektiert werden können. Auch in der vorliegenden Arbeit stand nach der erfolgreichen Selektion und Charakterisierung spezifischer cDNA-Sequenzen die Isolation entsprechender nukleärer Gene im Mittelpunkt meines Interesses. Die Prozedur der Erstellung einer genomischen Klonbank läßt sich durch folgende essentielle Schritte charakterisieren (vgl. III.F. und Abb. 26) :

- die Präparation hochmolekularer, eukaryotischer DNA
- die enzymatische oder mechanische Fragmentierung der eukaryotischen DNA
- die Präparation und Restriktion der Vektor-DNA
- die Präparation eines effizienten in vitro Verpackungsextraktes
- die Ligation der DNA-Komponenten
- die in vitro Verpackung der rekombinanten DNA
- die Amplifizierung der Klonbank

Ähnlich wie bei der Erstellung der cDNA-Klonbank stehen zu Beginn Entscheidungen an, die die Qualität der genomischen Klonbank entscheidend mitbestimmen. Dazu gehören die Wahl des Klonierungsvektors und in Verbindung damit die Wahl des Restriktionsenzyms, mit dem die nukleäre DNA fragmentiert werden soll. Grundsätzlich stehen für die Konstruktion der genomischen Klonbank drei Vektorsysteme zur Verfügung (Bakteriophage-Lambda, Cosmid, Plasmid) mit denen bereits genomische Klonbanken für verschiedene tierische und pflanzliche Spezies erstellt wurden. Durch die Wahl des Vektorsystems und des Vektors sind dann bereits die meisten übrigen Klonierungsparameter festgelegt, z.B. die Größe der klonierbaren DNA und die Restriktionsenzyme, die für die Fragmentierung der nukleären DNA in Betracht kommen. Für die Klonierung der nukleären DNA von Spinacia oleracea wurde das Lambda-System gewählt, da es neben seiner hohen Klonierungseffi-

zienz erhebliche Vorteile bei der Selektion spezifischer DNA-Sequenzen durch Hybridisierung bietet. Lambda-Klonbanken wurden für zahlreiche Organismen, wie Drosophila melanogaster (Maniatis et al., 1978), Hefe (Struhl et al., 1976) Mensch (Lawn et al., 1978), Maus (Blattner et al.,1978) und Ratte (Sargent et al., 1979) erstellt. Der Lambda-Vektor EMBL4, der letztlich für die Klonierung der nukleären DNA von Spinat ausgewählt wurde, besitzt Klonierungsstellen für SalI-, EcoRI- und BamHI-restringierte Fremd-DNA. Da eine möglichst umfangreiche Klonbank erstellt werden sollte, wurde die Kern-DNA mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell verdaut (Sinsheimer, 1977), um möglichst viele verschiedene DNA-Fragmente eines bestimmten Molekulargewichtsbereiches (10-20 kb) zu erzeugen. Die Sau3A-restringierten DNA-Fragmente lassen sich in BamHI-restringierte EMBL4-DNA inserieren. Nur durch die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme zur Fragmentierung nukleärer DNA ist die Konstruktion einer Klonbank möglich, die die Existenz aller nukleärer Sequenzen wahrscheinlich macht. Hierzu gehören Restriktionsenzyme, die eine Erkennungssequenz von 4 Basen besitzen, wie HaeIII (Lawn et al., 1978), AluI (Lawn et al., 1978) und die Isoschizomere MboI (van Der Ploeg et al., 1980) und Sau3A. Aber auch EcoRI-restringierte nukleäre DNA (EcoRI-Erkennungssequenz besteht aus 6 Basen) wurde schon zur Erstellung einer genomischen Klonbank mit Erfolg eingesetzt (jüngst auch in unserem Labor).

Für die genomische Klonierung ist die Fraktionierung der partiell restringierten Kern-DNA aus zwei Gründen unerläßlich. Erstens kompetieren die kleineren und größeren DNA-Fragmente unfraktionierter DNA bei der Ligation mit den DNA-Fragmenten geeigneter Klonierungsgröße. Dadurch ist die Klonierungseffizienz nur gering, denn es werden nur solche Moleküle effizient in vitro verpackt und transduziert, die in ihrer Größe etwa der Lambda-DNA (75-105%) entsprechen (Feiss et al., 1977). Zweitens besteht die Gefahr, daß kleine Fragmente miteinander ligieren, dann als rekombinantes Segment in den Vektor inseriert und kloniert werden. Die Größenfraktionierung kann durch eine Agarosegelelektrophorese (Aaij und Borst, 1972) oder durch eine Zentrifugation im Saccharosegradienten erfolgen. Die restringierte DNA läßt sich über die Agarosegelelektrophorese zwar präziser fraktionieren, jedoch können lösliche Bestandteile der Agarose die DNA-Präparation kontaminieren und spätere enzymatische Reaktionen inhibieren. Daher wurde die DNA-Fraktionierung im Saccharosegradienten bevorzugt, die solche unerwünschten Nebenwirkungen ausschließt. Eine weitergehende Fraktionierung der DNA-Fragmente geeigneter Klonierungsgröße, etwa durch RPC-5

Chromatographie (Hardies und Well, 1976; Edgell et al., 1979) empfiehlt sich, wenn ein bestimmtes Gen isoliert werden soll und seine Existenz in der jeweiligen DNA-Fraktion nachgewiesen werden kann.

Die Suche nach bestimmten Genen in einer genomischen Klonbank ist begleitet von der Frage nach der Wahrscheinlichkeit ihrer Auffindung. Diese Frage kann jedoch nicht schlüssig beantwortet werden, denn die Faktoren, die hier eine Rolle spielen, sind vielfach unbekannt oder nur schwer zu definieren. Allerdings steht fest, daß die Möglichkeit eine bestimmte Sequenz zu isolieren, nur dann gegeben ist, wenn die genomische Klonbank entsprechend umfangreich ist. Dabei ist nicht nur die Absolutmenge rekombinanter Phagen von Bedeutung, sondern vor allem ihre Anzahl pro eingesetzter DNA-Menge. Das heißt, je größer die Klonierungseffizienz ist, desto wahrscheinlicher ist die Isolation eines bestimmten Genes. Die Klonierungseffizienz ist ihrerseits abhängig von der Qualität der nukleären DNA-Fragmente und der Vektor-DNA, den Ligationsbedingungen, dem verwendeten Wirtsbakterienstamm und vor allen Dingen von der Qualität des *in vitro* Verpackungsextraktes. Die Verwendung eines schlechten *in vitro* Verpackungsextraktes kann selbst bei optimaler Konditionierung der übrigen Klonierungsbedingungen die Klonierungseffizienz um 2-3 Zehnerpotenzen reduzieren oder gar die Klonierung unmöglich machen. Demgegenüber lassen sich nicht optimale Qualitäten der DNA-Komponenten sehr oft durch einen effizienten *in vitro* Verpackungsextrakt kompensieren. Für die genomische Klonierung der Spinat-DNA wurde ein Verpackungsextrakt präpariert (beschrieben bei Maniatis et al., 1982) und mit ungeschnittener und geschnittener, religierter EMBL4-DNA auf seine Effizienz getestet. Dabei ergaben sich 5×10^8 Plaques (ungeschnittene EMBL4-DNA) und 5×10^7 Plaques (geschnittene und religierte EMBL4-DNA) pro µg DNA. Die Qualität des Verpackungsextraktes ist für die Klonierung der nukleären DNA aus Spinat von besonderer Bedeutung, da sich im Lambda-System pflanzliche, nukleäre DNA wesentlich schlechter klonieren läßt, als tierische, nukleäre DNA (B.Hohn, persönliche Mitteilung). Durch die optimale Abstimmung aller Klonierungsbedingungen konnte die Klonierungseffizienz bis auf 10^6 Plaques/µg rekombinante DNA gesteigert werden. Dies entspricht etwa dem Zehnfachen der üblichen Ausbeute, die bei pflanzlicher, nukleärer DNA im allgemeinen bei 10^5 Plaques pro µg DNA liegt (B.Hohn, persönliche Mitteilung).

Aus der cDNA-Klonbank von Spinat konnten fünf verschiedene Klone isoliert werden, die cDNA-Sequenzen für PC, LHCP, DEL, SSU und das 34kd-Polypeptid enthalten. Diese cDNA-Klone wurden alle durch Hybridselektion und in vitro RNA-Translation im Kaninchen-Retikulocytenlysat selektiert. Die in vitro Translationsprodukte wurden zur Identifizierung mit monospezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Der Identifizierung der cDNA-Fragmente folgte ihre Charakterisierung durch Sequenzierung und die Hybridisierung radioaktiv markierter cDNA-Fragmente gegen Poly(A)$^+$-RNA und HindIII-restringierte Kern-DNA von Spinat. Außerdem wurden mit zellfrei synthetisierten Vorstufen der Polypeptide (mit pLHCP, pPC und pSSU) und isolierten Chloroplasten von Spinat in vitro Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Die experimentellen Ergebnisse lassen unter anderem Rückschlüsse auf die Natur der mRNA und des jeweiligen Polypeptides zu und wernachfolgend jeweils gesondert diskutiert.

Plastocyanin: Plastocyanin ist ein kleines, zwei Kupferatome tragendes Polypeptid, das als membranperiphere Untereinheit mit dem Reaktionszentrum des Photosystems I assoziiert ist. Das Polypeptid ist ein Glied in der Elektronentransportkette zwischen den Photosystemen I und II und fungiert vermutlich als Elektronendonator für das P_{700}-Chlorophyll a-Apoprotein im Reaktionszentrum des Photosystems I (von Wettstein et al., 1981 und 1982). Das reife Polypeptid besitzt ein Molekulargewicht von ca. 10 kd. Plastocyanin ist ein kernkodiertes Polypeptid und wird als höhermolekulare Vorstufe im Cytoplasma synthetisiert. Die Vorstufe besitzt ein Molekulargewicht von etwa 21 kd und kann in vitro in den Chloroplasten importiert werden (Grossman et al., 1982). Die Vorstufe wird dabei zum reifen Polypeptid prozessiert und kann in seiner korrekten topologischen Position im Chloroplasten nachgewiesen werden. Die Analyse der cDNA-Sequenz für PC wurde durch die Tatsache erleichtert, daß die Aminosäuresequenz von Plastocyanin durch die Sequenzierung des Polypeptides bei Kartoffel (Ramshaw et al., 1974a), Bohne (Ramshaw et al., 1974b), Holunder (Scawen et al., 1974), Kürbis (Scawen und Boulter, 1974) und auch bei Spinat determiniert worden ist (Scawen et al., 1975). Bei allen Spezies beträgt das Molekulargewicht des reifen Polypeptides 10,5 kd und seine Sequenz besteht aus 99 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz von Plastocyanin aus Spinat, die von Scawen et al. (1975) ermittelt wurde, ist identisch mit der Aminosäuresequenz, die aus dem Kodierungsraster des cDNA-Fragmentes für PC (diese Arbeit) abgeleitet wurde. Die PC-

Vorstufe sollte bei ihrem Molekulargewicht von ca. 21 kd aus etwa 200 Aminosäuren (entspricht 600 bp) bestehen. Berücksichtigt man, daß der nicht kodierende 3'-Bereich der PC-mRNA vom Stoppkodon UAA (TAA) bis zur potentiellen Polyadenylierungsstelle 90 b lang ist, und daß die Länge der PC-mRNA ca. 850 b beträgt (vgl. III.D.1. und III.C.3.), so sollte der nicht kodierende 5'-Bereich der PC-mRNA etwa 160 b umfassen. Vermutlich ist die 5'-Region jedoch kürzer, da die mRNA an ihrem 3'-Ende ein A-Polymer trägt.

Delta-Untereinheit der ATP-Synthase: Die ATP-Synthase ist ein multimerer Polypeptidkomplex der Thylakoidmembran. Er ist aus zwei Subkomplexen (CF_0 und CF_1) aufgebaut und koppelt die Translokation von Protonen durch die Membran mit der Synthese von ATP. Der CF_0-Teil ist Bestandteil der Thylakoidmembran und bildet einen Protonenkanal durch die Membran. Der CF_1-Teil katalysiert die Synthese von ATP und ragt in das Organellenstroma. Der CF_1-Komplex ist aus fünf Untereinheiten, nämlich α, β, γ, δ und ε zusammengesetzt. Die Polypeptide γ und δ sind nukleären Ursprungs (Westhoff et al., 1981) und werden als Vorstufen im Cytoplasma synthetisiert (γ = 45 kd, δ = 27,5 kd). Sie werden beim Import in den Chloroplasten zu reifen Polypeptiden prozessiert (γ = 37 kd, δ = 19,5 kd). Der CF_0-Komplex besteht aus den Untereinheiten CF_0-I, -II und -III. Das Polypeptid CF_0-II ist genetisch nukleären Ursprungs und wird im Cytoplasma synthetisiert (vgl. Einleitung). Die Funktion der Delta-Untereinheit im ATP-Synthasekomplex ist nicht eindeutig geklärt. Vermutlich ist das Polypeptid an der Bindung des CF_1-Komplexes an den CF_0-Teil beteiligt. Die Aminosäuresequenz der Delta-Untereinheit ist für eukaryotische Organismen bis heute unbekannt. Die möglichen Kodierungsraster der DEL-cDNA von Spinat mit den korrespondierenden Aminosäuresequenzen (vgl. III.D.2.) geben keinen Aufschluß über die Primärstruktur des Delta-Polypeptides. Sie sind zu kurz, um durch den Vergleich mit den Aminosäuresequenzen analoger Untereinheiten von E.coli (Gay und Walker, 1981; Nielson et al., 1981; Saraste et al., 1981) entscheiden zu können, welche der beiden potentiellen Sequenzen die tatsächliche ist. Allerdings bieten sich durch die DEL-cDNA von Spinat optimale Voraussetzungen, um durch Hybridisierung weitere DNA-Sequenzen für die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase aus einer cDNA- oder genomischen Klonbank zu selektieren.

34kd-Polypeptid des Wasserspaltungskomplexes: Die lichtinduzierte Oxydation von Wasser ist für die Photosynthese von zentraler Bedeutung. Unter gleichzeitiger Entwicklung von Sauerstoff werden bei der Spaltung von Wasser Elektronen freigesetzt, die der Elektronentransportkette des Photosyntheseapparates zugeführt werden. An der oxydativen Spaltung des Wassers sind vermutlich sechs Polypeptide beteiligt (Ljungberg et al., 1984), die gemeinsam den Wasserspaltungskomplex bilden. Der Komplex ist mit dem Photosystem II assoziiert und an der inneren Thylakoidmembran lokalisiert. Wenigsten drei der Untereinheiten des Wasserspaltungskomplexes sind nukleären Ursprungs (Westhoff et al., 1985). Sie besitzen Molekulargewichte von 34, 23 und 16 kd und werden als Vorstufen im Cytoplasma synthetisiert. Die Vorstufen sind ca. 6-10 kd größer als die reifen Polypeptide. Ober den genetischen Ursprung der restlichen drei Untereinheiten (22, 24 und 16 kd) des Wasserspaltungskomplexes ist noch nichts bekannt. Das 34kd-, das 23kd- und das 16kd-Polypeptid können durch Waschungen unter verschiedenen Salzbedingungen von der Oberfläche der inneren Thylakoidmembran abgelöst und dann einzeln isoliert werden (Åkerlund et al., 1982). Im Gegensatz zum 23kd- und 16kd-Polypeptid ist das 34kd-Polypeptid membrangebunden und als solches läßt es sich sehr viel schwerer ablösen als die beiden anderen Polypeptide. An der lichtinduzierten Oxydation des Wassers sind divalente Manganionen als Kofaktoren beteiligt. In diesem Zusammenhang wird das 34kd-Polypeptid als das Mn-bindende Polypeptid und katalytische Zentrum der Wasserspaltung diskutiert. Allerdings stehen gegenwärtig eindeutide Beweise für diese Hypothese noch aus. Die Aminosäurezusammensetzungen der drei Polypeptide (34, 23 und 16 kd) sind bei Spinat durch Untersuchungen von Kuwabara und Murata (1982) am 34kd-Polypeptid und von Yamamoto et al. (1983) am 23kd- und am 16kd-Polypeptid bekannt geworden. Sie sind allesamt hydrophil durch die Aminosäuren Asparagin (Asn), Asparaginsäure (Asp), Glutamin (Gln), Glutaminsäure (Glu), Arginin (Arg) und Lysin (Lys), die unter physiologischen Bedingungen zum Teil positiv bzw. negativ geladen sind und in allen drei Polypeptiden stark vertreten sind. Die Aminosäure Lysin (Lys) kommt besonders im 34kd-Polypeptid häufig vor, so daß es als das "lysinreiche" Polypeptid bezeichnet wird.

Aus der cDNA-Klonbank von Spinat konnte eine cDNA-Sequenz isoliert werden, die wohl kodierende Sequenzen des 34kd-Polypeptides enthält. Das ließ sich durch eine Reihe von experimentellen Daten untermauern. Mit dem cDNA-Fragment wurde eine mRNA-Spezies selektiert, deren in vitro Translationsprodukt mit

der Vorstufe des 34kd-Polypeptides unter denaturierenden Bedingungen komigriert. Das Translationsprodukt ergab außerdem eine positive Immunreaktion mit dem monospezifischen 34kd-Antikörper. Um die Spezifität der mRNA-Selektion zu gewährleisten, wurden zwei Subfragmente der 34kd-cDNA, die je etwa 50% der kodierenden Region des cDNA-Fragmentes enthielten, zur mRNA-Selektion eingesetzt. Die in vitro Translationsprodukte der hybridselektierten mRNAs waren für beide Subfragmente identisch. In beiden Fällen konnten die Translationsprodukte auch mit dem 34kd-Antikörper immunpräzipitiert werden. Ein zusätzlicher Hinweis auf die Identität des cDNA-Fragmentes ergab sich aus der korrespondierenden Aminosäuresequenz und dem Vergleich mit der bekannten Aminosäurezusammensetzung des 34kd-Polypeptides von Spinat. Nach Analysen von Kuwabara und Murata (1982) besteht das Strukturpolypeptid aus 305 Amniosäuren. Das Leseraster der 34kd-cDNA besitzt eine Kodierungskapazität von 170 Aminosäuren, so daß sie etwa 56% des reifen Polypeptides enthält (vgl. III.D.4.). Die Aminosäurezusammensetzung des abgeleiteten, unvollständigen Polypeptides entspricht tendenziell der Zusammensetzung nach Kuwabara und Murata (1982). Das heißt, die abgeleitete Polypeptidsequenz enthält vergleichbare prozentuale Anteile jeder Aminosäure. Eine Ausnahme stellen die Aminosäuren Methionin und Cystein dar. Nach Kuwabara und Murata (1982) enthält das reife 34kd-Polypeptid von Spinat ein Methionin und zwei Cysteine. Das abgeleitete Polypeptid (etwa 56% des reifen Polypeptides) enthält bereits ein Methionin, jedoch kein Cystein. Hinsichtlich des Methionin würde dies bedeuten, daß der N-terminale Bereich des Polypeptides kein Methionin enthält, so daß das reife 34kd-Polypeptid nicht wie die übrigen kernkodierten, plastidären Polypeptide mit Methionin beginnt. Die strukturell oftmals wichtigen Cysteine müssen beim 34kd-Polypeptid von Spinat offenbar ausschließlich im N-Bereich des Polypeptides lokalisiert sein.

Chlorophyll a/b-Apoprotein des PSII-LHC: Durch die Solubilisierung der Thylakoidmembran von Chloroplasten mittels Detergenzien werden zahlreiche Polypeptide freigesetzt, die durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden können (siehe Einleitung). In Abhängigkeit zu den verwendeten Bedingungen der Solubilisierung und elektrophoretischen Trennung können bis zu zehn verschiedene chlorophyllhaltige Separationsprodukte gefunden werden, die Aggregate aus Chlorophyllmolekülen und Polypeptiden darstellen (Anderson, 1975; Delepelaire und Chua, 1979; Machold et al., 1979). Die Aggregate können in Gegenwart von Detergenzien zerstört werden, wobei die sogenannten Apoproteine und freies Chlorophyll entstehen. Eines dieser Aggregate ist der Chlorophyll a/b-Antennenkomplex, der von Thornber und Highkin (1974) als "light harvesting complex" (LHC) bezeichnet wurde. Dieser Protein/Pigment-Komplex steht als Antennenkomplex in direkter funktioneller und räumlicher Verbindung mit dem Reaktionszentrum des Photosystem II. In Verbindung mit Carotinoiden, die hierbei als zusätzliche akzessorische Pigmente dienen, sammelt der Komplex Lichtenergie für die Photosynthese. Der Chlorophyll a/b-Antennenkomplex besteht aus einer Gruppe von 4-5 verwandten Polypeptiden, die sehr abundant sind und ein Molekulargewicht zwischen 21 und 25 kd besitzen. Die ersten Hinweise auf den genetischen Ursprung der Apoproteine des Komplexes kamen durch Machold und Aurich (1972). Sie stellten fest, daß bei Vicia faba die Synthese des quantitativ dominierenden Apoproteins des Komplexes durch Cycloheximid, nicht aber durch Chloramphenicol inhibiert wurde. Daraus folgte, daß zumindest dieses Apoprotein des Chlorophyll a/b-Antennenkomplexes im Cytoplasma synthetisiert wird und damit genetisch nukleären Ursprungs ist. Später zeigten dann auch Apel und Kloppstech (1978) und Schmidt et al. (1980), daß die beiden abundantesten Apoproteine des Komplexes im Cytoplasma synthetisiert werden. Mittlerweile ist bekannt, daß alle Apoproteine des Chlorophyll a/b-Antennenkomplexes als Vorstufen, die etwa 4 kd größer sind als die reifen Polypeptide, im Cytoplasma synthetisiert werden. Sowohl die Synthese dieser Vorstufen, als auch die Synthese der entsprechenden mRNA-Spezies wird durch Licht induziert (Apel und Kloppstech, 1978; Apel, 1979). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Gallagher und Ellis (1982), die feststellten, daß die Transkriptionsrate der Gene des Chlorophyll a/b-Antennenkomplexes in isolierten Zellkernen aus den Keimblättern im Licht gewachsener Keimlinge etwa neunfach so hoch ist wie bei den Blättern etiolierter Keimlinge. Demgegenüber ist die Transkriptionsrate der ribosomalen Gene unter gleichen Bedingungen nur verdoppelt. Eingehendere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Transkription der nukleären Gene des Chlorophyll a/b-Kom-

plexes durch das Phytochromsystem induziert wird, und daß eine zweite Lichtreaktion, die die Konversion von Protochlorophyll zu Chlorophyll induziert, für den Zusammenbau des Chlorophyll a/b-Antennenkomplexes und seine Integration in die Thylakoidmembran notwendig ist (Apel, 1979). Wie alle Vorstufen kernkodierter, plastidärer Polypeptide werden auch die Vorstufen der Apoproteine (pLHCP) des Chlorophyll a/b-Antennenkomplexes beim Import in die Plastide (s.u.) zu reifen Polypeptiden prozessiert (Schmidt et al., 1980).

Die Aminosäuresequenz eines der Chlorophyll a/b-bindenden Polypeptide einer höheren Pflanze ist erst durch die Arbeiten von Coruzzi et al. (1983) und Cashmore (1984) bekannt geworden. Die Sequenz des reifen Polypeptides wurde aus einer cDNA-Sequenz abgeleitet (Coruzzi et al., 1983). Das zugehörige nukleäre Gen von Erbse wurde zuerst von Cashmore (1984) isoliert und charakterisiert. Dadurch konnte auch die Aminosäuresequenz des Transitpolypeptides ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit gelang die Isolation mehrerer cDNA-Klone für möglicherweise verschiedene Chlorophyll a/b-bindende Polypeptide aus Spinat, von denen ein Klon näher charakterisiert wurde. Die untersuchte cDNA-Sequenz kodiert für ca. 94% des reifen Polypeptides von Spinat und ermöglicht damit den Sequenzvergleich zum Polypeptid von Erbse (s.u.). Wie bereits erwähnt wurde, sind die 4-5 Polypeptide des Chlorophyll a/b-Antennenkomplexes miteinander eng verwandt. Das bestätigt auch die Tatsache, daß die mRNA-Spezies von mindestens vier Apoproteinen des Komplexes mit der sequenzierten LHCP-cDNA selektiert werden können (vgl. Abb. 8). Außerdem zeigen alle Polypeptiduntereinheiten, sowohl als *in vitro* Translationsprodukte (vgl. Abb. 8), als auch als authentische Polypeptide eine positive Immunreaktion mit demselben Antikörper. Diese Ergebnisse deuten auf starke Homologien zwischen den Aminosäuresequenzen der verschiedenen Polypeptide sowie ihrer mRNAs hin.

Ähnliche Resultate ergeben sich aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen für die LHC-Polypeptide von Erbse, die aus einer cDNA-Sequenz (Coruzzi et al., 1983) und einer genomischen Sequenz abgeleitet wurden (Cashmore, 1984). Das nukleäre Gen ist hierbei nicht der Ursprungsort der mRNA, die bei der Synthese der LHCP-cDNA der Reversen Transkriptase als Matrize diente. Die abgeleiteten Polypeptidsequenzen (Erbse) unterscheiden sich in fünf Aminosäuren. Das heißt, die Homologie beträgt ca. 98%. Die cDNA-Sequenz und die genomische Sequenz von Erbse selektieren, im Gegensatz zu der LHCP-cDNA von Spinat, nicht 4-5 mRNA-Spe-

zies für die verschiedenen Polypeptide des Chlorophyll a/b-Antennenkomplexes (Cashmore, 1984). Bei Erbse entsprechen die in vitro Translationsprodukte der selektierten mRNAs (mit cDNA- und genomischer DNA-Sequenz) nur der quantitativ dominierenden Untereinheit des Komplexes. Hieraus folgt, daß bei Erbse die dominierende Untereinheit vermutlich eine Mischung aus Polypeptiden ist, die noch näher miteinander verwandt sind als die übrigen Polypeptide des Komplexes und ebenfalls durch verschiedene nukleäre Gene kodiert werden.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der LHC-Polypeptide von Spinat (abgeleitet aus der cDNA-Sequenz, Klon pSocLHCP) und Erbse (abgeleitet aus der genomischen DNA-Sequenz) zeigt deutlich, daß auch zwischen verschiedenen Pflanzenspezies die Polypeptide des Komplexes eng verwandt sind (Abb. 18). Die Homologie beträgt ca. 95%, so daß die Sequenzen der Polypeptide als stark konserviert einzustufen sind. Für diese Vermutung gibt es noch einen Hinweis, der im Zusammenhang zur molekularen Organisation des untersuchten LHCP-Genes von Erbse (Cashmore, 1984) zu finden ist. Das Gen enthält im Unterschied zu den analysierten SSU-Genen von Erbse (Coruzzi et al., 1984), Weizen (Broglie et al., 1983), Sojabohne (Berry-Lowe et al., 1982), Tabak (Mazur et al., 1985) und Spinat (diese Arbeit) keine Introns, die bei den SSU-Genen funktionelle Domänen trennen. Das bedeutet, daß das primäre Transkript des LHCP-Genes von Erbse während seiner Reifung nur an oder in den nicht kodierenden 3'- und 5'-Regionen modifiziert wird. Obwohl in der Vorstufe des LHC-Polypeptides mindestens zwei funktionelle Domänen unterschieden werden können, nämlich das Transitpolypeptid und das Strukturpolypeptid, sind diese Einheiten im Gen unmittelbar miteinander verknüpft.

Unter Verwendung der analysierten LHCP-cDNA von Spinat als Hybridisierungsprobe gelang im Rahmen der Diplomarbeit von Ch.Rother (1985) die Selektion von drei LHCP-Klonen aus einer genomischen Lambda-Klonbank von Spinat (EcoRI-partialrestringierte und im EMBL4-Vektor klonierte Kern-DNA). Die genomischen Sequenzen der drei LHCP-Klone unterscheiden sich in den Restriktionsmustern für diverse Enzyme, so daß die Vermutung naheliegt, daß es sich um DNA-Sequenzen handelt, die an verschiedenen Stellen im Genom von Spinat lokalisiert sind. Somit enthalten die klonierten genomischen Sequenzen vermutlich verschiedene Mitglieder der LHCP-Genfamilie. Eingehendere Untersuchungen werden gegenwärtig durchgeführt.

Das Hydropathieprofil des LHC-Strukturpolypeptides von Erbse (vgl. Abb. 19 A) zeigt deutliche Unterschiede zwischen seinen mittleren sowie C-terminalen Abschnitten (hydrophob) und seinem N-terminalen Bereich (hydrophil). Der N-terminale Bereich des reifen Polypeptides ist von besonderem Interesse. Er enthält zwei Threoninreste, an denen die lichtinduzierte, reversible Photophosphorylierung stattfinden soll (Bennett et al., 1980; Mullet, 1983). Dieser Sequenzbereich ist auf der cDNA von Spinat nicht enthalten, da die LHCP-cDNA von Spinat nur für 94% des reifen Polypeptides kodiert. Ein Vergleich der Hydropathieprofile des LHC-Polypeptides von Erbse und des verfügbaren Teils des LHC-Polypeptides von Spinat zeigt, daß die charakteristischen, stark hydrophoben Sequenzabschnitte I-III in ihrer Lage im Polypeptid identisch sind und in ihrer Aminosäurezusammensetzung kaum divergieren. Aber auch die weniger hydrophoben Segmente zwischen den Abschnitten I-III unterscheiden sich nur wenig zwischen den Polypeptiden von Erbse und Spinat (vgl. Abb. 19 A und 19 B).

Der Chlorophyll a/b-Proteinkomplex vermittelt zwischen den Thylakoidmembranen bei der Ausbildung der Granastapel im Chloroplasten. Vermutlich ist der N-terminale Abschnitt des reifen Polypeptides dabei maßgeblich beteiligt (Burke et al., 1979). Dieser Prozess wird in vivo wohl durch Kationen getriggert. In vitro lassen sich solubilisierte Chlorophyll a/b-Proteinkomplexe durch Kationen spontan in eine kristalline Ordnung überführen, die derjenigen in vivo gleicht (Arntzen und Burke, 1980). Die zweidimensionalen Kristalle können dann Strukturanalysen unterzogen werden. Die dreidimensionale Struktur des Chlorophyll a/b-Proteinkomplexes von Erbse wurde durch Kühlbrandt (1984) näher untersucht und beschrieben. Demnach ist dieser Proteinkomplex ein trimeres Transmembranprotein, das aus drei strukturell äquivalenten Monomeren aufgebaut ist. Er ist ca. 59 Å dick und ragt über beide Oberflächen der Thylakoidmembran hinaus. Die drei Untereinheiten sind in regelmäßiger Anordnung um eine zentrale Symmetrieachse gruppiert, die die Thylakoidmembran in vertikaler Richtung durchzieht. Nach der Beschreibung von Kühlbrandt (1984) besteht jedes Monomer aus drei zylindrischen Domänen mit einem Durchmesser von 15-20 Å. Die Domänen durchziehen die Thylakoidmembran teilweise oder gänzlich in vertikaler Richtung. Möglicherweise sind die hydrophoben Sequenzabschnitte I-III (vgl. Hydropathieprofil) des LHC-Polypeptides von Erbse als helikale Transmembransegmente mit den drei zylindrischen Domänen des Chlorophyll a/b-Proteinkomplexes nach Kühlbrandt (1984) identisch. Der gereinigte Chlorophyll a/b-Proteinkomplex von Erbse enthält mindestens zwei Polypeptide, die in verschiedenen Quantitäten vor-

liegen und unterschiedliche Molekulargewichte besitzen (25 und 27 kd), aber zueinander stark homolog sind. Bei Spinat existieren mindestens vier verschiedene LHC-Polypeptide mit ähnlichen Eigenschaften. Das genaue Molekulargewicht der größeren Untereinheit von Erbse beträgt 28,512 kd (Cashmore, 1984). Das Molekulargewicht des Chlorophyll a/b-Proteinkomplexes wird auf ca. 100 kd geschätzt, wobei ein spezifisches Volumen von 1,3 $Å^3$ pro Dalton zugrunde gelegt wurde (die Daten wurden von Kühlbrandt aus Untersuchungen am Bakterienrhodopsin (Henderson und Unwin (1975) abgeleitet). Demzufolge sollte der trimere Chlorophyll a/b-Proteinkomplex eher aus drei denn aus sechs Polypeptiden aufgebaut sein. Es ist daher anzunehmen, daß die verschiedenen LHC-Polypeptide von Erbse strukturell äquivalent sind und im trimeren Komplex gegeneinander ausgetauscht werden können. In ähnlicher Weise treten in den tetrameren Isoenzymen der Laktatdehydrogenase zwei verschiedene, aber eng verwandte Polypeptide in allen möglichen Permutationen auf (Markert und Møller, 1959). Die Chlorophyll a/b-Proteinkomplexe von Spinat (Simpson, 1979) und Gerste (Ryrie et al., 1980) zeigen ähnliche Eigenschaften und eine vergleichbare kristalline Ordnung wie der Komplex von Erbse.

SSU der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase: Die Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase ist das abundanteste Stromaprotein in den Chloroplasten von C_3 Pflanzen, und wahrscheinlich ist es sogar das häufigste Protein der Welt (Siegelman und Hind, 1978). Das Holoenzym katalysiert sowohl die Carboxylierung im Calvinzyclus, als auch die Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat in der Photorespiration. Das Enzym ist bei den höheren Pflanzen aus acht identischen großen Untereinheiten und acht identischen kleinen Untereinheiten aufgebaut. Die große Untereinheit (LSU) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 55 kd und wird durch die plastidäre DNA kodiert (Coen et al., 1977) und im Chloroplastenstroma synthetisiert (Blair und Ellis, 1973). Die kleine Untereinheit (SSU) ist kernkodiert (Kawashima und Wildman, 1972) und sie wird als höhermolekulare Vorstufe im Cytoplasma synthetisiert (Highfield und Ellis, 1978; Chua und Schmidt, 1978; Cashmore et al., 1978). Das reife Polypeptid besitzt ein Molekulargewicht von ca. 14 kd und die Vorstufe eines von etwa 20 kd.

Neben den cDNA-Klonen für PC, LHCP, DEL und das 34kd-Polypeptid konnten auch mehrere Klone für SSU aus der cDNA-Klonbank isoliert werden. Eines der cDNA-Fragmente (Klon pSocSSU) wurde sequenziert und zur Selektion eines SSU-Genes

aus der genomischen Klonbank von Spinat eingesetzt. Die Sequenzierung des cDNA-Fragmentes für die SSU ergab, daß es die gesamte kodierende Sequenz für das SSU-Transitpolypeptid enthielt und darüber hinaus auch den nicht kodierenden 5'-Bereich der mRNA für SSU. Wie sich später durch Hybridisierung nukleärer SSU-Sequenzen gegen die identifizierten SSU-cDNAs zeigte, besitzt keines der übrigen cDNA-Fragmente Sequenzen, die für das SSU-Transitpolypeptid kodieren (Abb. 11). Die Existenz eines solchen cDNA-Fragmentes darf als äußerst ungewöhnlich angesehen werden, da die cDNA-Synthese in der Regel am 3'-Ende der mRNA initiiert und daher Sequenzen der 5'-Region einer mRNA normalerweise nur in "Vollängen-cDNAs" vertreten sind. Für die vorliegende Arbeit ist diese cDNA in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Erstens konnte aus der cDNA-Sequenz die Primärstruktur des SSU-Transitpolypeptides für Spinat abgeleitet werden, und zweitens erleichterte die cDNA-Sequenz die Analyse des genomischen SSU-Genes, besonders in seinem nicht kodierenden 5'-Bereich.

Alle bekannten, kernkodierten Untereinheiten plastidärer Proteinkomplexe werden im Cytoplasma als höhermolekulare Vorstufen synthetisiert (siehe Einleitug). Um ihren Bestimmungsort, d.h. die Thylakoidmembran oder das Stroma des Chloroplasten zu erreichen, müssen die Polypeptidvorstufen die Hüllmembranen des Chloroplasten passieren. Während oder nach ihrem Transfer durch die Membranen werden die Vorstufen enzymatisch prozessiert. Sie werden dann als reife Polypeptide in ihren Bestimmungskomplex integriert. Die Aufklärung der Mechanismen, die in den Transport der Polypeptide in den Chloroplasten -und gleiches gilt für Mitochondrien- involviert sind, ist heute eine zentrale Frage in der modernen Biologie der Organellen. Zur Beantwortung dieser Frage bietet sich daher der Vergleich mit Transportsystemen der Mitochondrien (Schatz und Mason, 1974; Tzagaloff et al., 1979; Reid und Schatz, 1982a; Reid und Schatz 1982b) und auch des endoplasmatischen Retikulums an (Davis und Tai, 1980; Wickner, 1979; Blobel, 1980). Der Transport sekretorischer Proteine in oder durch das endoplasmatische Retikulum ist am besten untersucht. Die Synthese der meisten sekretorischen Proteine findet an Ribosomen statt, die an das endoplasmatische Retikulum gebunden sind. Ihr Membrantransport erfolgt dann ko-translational, d.h. noch während ihrer Synthese (Redman und Sabatini, 1966; Harwood, 1980; Blobel, 1980). Die sekretorischen Proteine tragen an ihrem N-Terminus eine kurze, hydrophobe Signalsequenz (Blobel und Dobberstein, 1975a und 1975b) von 15-30 Ami-

nosäuren. Die Signalsequenz interagiert mit cytoplasmatischen Proteinen und verursacht die Bindung des Ribosoms an das endoplasmatisch Retikulum (Meyer, 1982). Noch während die Proteinsynthese abläuft, wird die Signalsequenz durch ein Enzym abgespalten, das im Lumen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Bei Mitochondrien hat man gefunden, daß cytoplasmatische 80S Ribosomen mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert sind (Kellems et al., 1974; Bennett et al., 1976). Allerdings gibt es keine Beweise für ihre obligatorische Beteiligung am Proteintransport in das Organell (Schatz und Butow, 1983). Wie bei den Mitochondrien wurden auch bei den Chloroplasten membrangebundene 80S Ribosomen in einen funktionellen Zusammenhang zum Proteintransport gebracht (Gooding et al., 1973; Laulhere und Dorne, 1977), jedoch gibt es hierfür zumindest bei höheren Pflanzen keine überzeugenden Beweise. Vielmehr ist gesichert, daß bei Mitochondrien und Chloroplasten der Proteintransport in diese Organellen post-translational erfolgt. Die ersten Hinweise auf post-translationale Transportprozesse bei Chloroplasten kamen von Dobberstein et al. (1977) bei Chlamydomonas reinhardtii sowie von Cashmore et al. (1978) und Roy et al.(1977) bei Erbse. Die Autoren konnten feststellen, daß die SSU-Vorstufe (pSSU) der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase an freien, cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wurde. Darüber hinaus wurde bei der Alge Chlamydomonas reinhardtii das Syntheseprodukt (pSSU) durch eine lösliche Protease post-translational in ein kleineres Produkt (SSU) überführt (Dobberstein et al., 1977). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, daß der Transport der SSU-Vorstufe (pSSU) in den Chloroplasten ein post-translationales Ereignis ist. Highfield und Ellis (1978) untermauerten die Hypothese, indem sie die SSU-Vorstufe aus Erbse mit isolierten Chloroplasten inkubierten. Aus der Tatsache, daß die in vitro synthetisierte SSU-Vorstufe dabei zum reifen Polypeptid (SSU) prozessiert wurde, und daß dieses Produkt vor einer enzymatischen Proteolyse geschützt war, schlossen die Autoren, daß die Vorstufe in den Chloroplasten transportiert worden war. Zur gleichen Zeit gelang auch Chua und Schmidt (1978) mit einem vergleichbaren experimentellen Ansatz, ebenfalls mit der SSU (für Spinat, Erbse und Chlamydomonas reinhardtii), der Nachweis, daß der Proteintransport in Chloroplasten post-translational erfolgt. Darüber hinaus konnten sie das importierte SSU-Polypeptid in seiner korrekten topologischen Position (als Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase) im Chloroplasten nachweisen.

Der Import cytoplasmatischer Polypeptide in Organellen (Chloroplasten oder Mitochondrien) ist grundsätzlich ein energieabhängiger Prozess, der bei beiden Orga-

nellen ATP als Energieträger voraussetzt (Grossman et al., 1980; Gasser et al., 1982a und 1982b; Schleyer et al., 1982). Bei Chloroplasten wird der Import der Polypeptide in vitro durch Licht stimuliert (Grossman et al., 1980). Die Zugabe von Komponenten, die den Elektronentransport und die Photophosphorylierung entkoppeln, inhibieren den Lichteffekt. Bei Mitochondrien hingegen ist ein elektrochemisches Potential über die innere Mitochondrienmembran notwendig, um den Import eines Polypeptides möglich zu machen (Gasser et al., 1982; Schleyer et al., 1982). Soweit bekannt ist, sind die Transitsequenzen kernkodierter, plastidärer Polypeptide für den Import in den Chloroplasten von essentieller Bedeutung. Es existieren bis heute keine Beispiele für plastidäre Polypeptide, die nicht als höhermolekulare Vorstufen synthetisiert werden und dennoch die äußere oder gar die innere Chloroplastenmembran passieren können. Bei Mitochondrien ist jedoch für das Cytochrom c bekannt, daß es ohne N-terminale Elongation im Cytoplasma synthetisiert wird. Cytochrom c wird dennoch durch die äußere Mitochondrienmembran transportiert und im Raum zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran durch die Addition einer Hämgruppe modifiziert (Zimmerman et al., 1979). Bei anderen mitochondriellen Proteinen des "Intermembranbereiches" ist jedoch die N-terminale Verlängerung für den in vitro Transport notwendig. Als Beispiele für solche mitochondriellen Polypeptide des "Intermembranbereiches seien das Cytochrom b2 und die Cytochrom c Peroxydase erwähnt, die als höhermolekulare Vorstufen im Cytoplasma synthetisiert werden. Das Cytochrom b2 wie auch die Cytochrom c Peroxydase werden bei ihrem Transport in den "Intermembranbereich" in einem zweistufigen Prozess zu reifen Polypeptiden prozessiert.

Um nachzuweisen, daß die im heterologen Translationssystem zellfrei synthetisierten, längeren Polypeptide in der Tat Vorstufen und nicht Artefakte darstellen, wurden von mir im Rahmen der vorliegenden Arbeit in vitro Rekonstitutionsexperimente mit zellfrei synthetisierten Polypeptidvorstufen (pSSU, pLHCP, pPC) und isolierten, intakten Chloroplasten von Spinat durchgeführt (vgl. III.E.). Der "in organello"-Import kernkodierter, plastidärer Polypeptide in Chloroplasten wurde bereits von Chua und Schmidt (1978) für die SSU-Vorstufe und von Grossman et al. (1980) für die LHCP-Vorstufe und auch für die PC-Vorstufe (Grossman et al. (1982) untersucht. Die Autoren translatierten Gesamt-Poly(A)$^+$-RNA zellfrei im Weizenkeimsystem und boten den isolierten Chloroplasten mit ^{35}S-Methionin markierte Polypeptidpopulationen zur Aufnahme an. Im Unterschied zu den Experimenten von Chua und Schmidt (1978) und Grossman et al. (1980 und 1982) konnte bei

meinen Untersuchungen von einzelnen, d.h. definierten mRNA-Spezies ausgegangen werden, die sich mittels der cDNA-Fragmente für SSU, PC und LHCP durch Hybridselektion aus der Gesamt-Poly(A)$^+$-RNA selektieren ließen. Damit war es möglich den isolierten, intakten Chloroplasten Polypeptidspezies einzeln, getrennt und in Kombination zur Aufnahme anzubieten. Die Untersuchungen machten deutlich, daß die cytoplasmatischen Polypeptide als höhermolekulare Vorstufen synthetisiert wurden (pLHCP, pSSU, pPC), und daß sie alle Signale für Import und Prozessing enthalten. Zudem konnten die prozessierten Polypeptide alle in ihren korrekten topologischen Positionen im Chloroplasten wiedergefunden werden. Das SSU-Polypeptid ließ sich in der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase und das LHC-Polypeptid in der Thylakoidmenbran nachweisen. Das Plastocyanin war locker mit der Thylakoidmembran assoziiert. Darüber hinaus widerlegten die Ergebnisse einmal mehr die Vermutung von Gooding et al. (1973) sowie Laulhere und Dorne (1977), daß der Transport kernkodierter, plastidärer Polypeptide in den Chloroplasten über membrangebundene Ribosomen, d.h. ko-translational erfolgt.

Die Transitsequenzen von SSU-Polypeptiden sind bis heute für sechs Spezies vollständig bekannt. Davon gehören Spinacia, Pisum, Glycine und Nicotiana zu den dikotylen und Triticum und Lemna zu den monokotylen Pflanzen. Die Transitpolypeptide treten bei allen Spezies als N-terminale Elongationen der reifen SSU-Polypeptide auf. Ihre Längen betragen 47 Aminosäuren bei Triticum, 55 Aminosäuren bei Glycine und 57 Aminosäuren bei Spinacia, Lemna, Nicotiana und Pisum. Diese Vielfalt vergleichbarer Transitsequenzen verschiedener Pflanzenspezies bietet die Möglichkeit strukturelle Gemeinsamkeiten in einen funktionellen Zusammenhang zum Transportprozess zu bringen. Es ist wahrscheinlich, daß die Transitsequenzen die Bindung der Polypeptidvorstufen an die äußere Chloroplastenmembran selbst wohl nicht initiieren können, denn dann würden die Transitpolypeptide, ähnlich den Signalsequenzen sekretorischer Polypeptide, an die Chloroplastenmembran binden, noch bevor die Synthese des gesamten Polypeptides abgeschlossen ist. Es gilt jedoch als erwiesen, daß die Synthese kernkodierter, plastidärer Polypeptide an freien Ribosomen stattfindet (s.o.). Das Transitpolypeptid könnte dennoch bei der Bindung der Polypeptidvorstufe an die Chloroplastenmembran von Bedeutung sein, denn seine zahlreichen Arginin- und Lysinreste geben der Transitsequenz unter physiologischen Bedingungen eine positive Gesamtladung. Da die Chloroplastenmembran negativ geladen ist, sind Wechselwirkungen zu den positiv geladenen

Aminosäuren Arginin und Lysin denkbar. Die Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Positionen dieser Aminosäuren in den Transitsequenzen weitgehend konserviert sind. Alternativ wären auch Wechselwirkungen dieser Arginin- und Lysinreste der Transitsequenz zu den negativ geladenen Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten des Strukturpolypeptides denkbar (Abb. 24 und 40). Diese Aminosäurereste des Strukturpolypeptides sind nämlich ebenfalls in ihren Positionen weitgehend konserviert. Es wird allgemein angenommen, daß die Tertiärstruktur der Polypeptidvorstufe, die wohl durch die Wechselwirkungen zwischen Transitsequenz und Strukturpolypeptid wesentlich beeinflußt ist, für die Bindungsreaktion von entscheidender Bedeutung ist. Wenn diese Hypethese zuträfe, so besäße jede kernkodierte, plastidäre Polypeptidspezies eine individuelle Transitsequenz. Hierfür gibt es Hinweise, denn ein Vergleich der Molekulargewichte von zahlreichen Polypeptidvorstufen mit den entsprechenden reifen Polypeptiden zeigt, daß die Transitsequenzen sehr längenheterogen sind (in Herrmann et al., 1983). Die PC-Vorstufe besitzt dabei mit ca. 11 kd die längste bekannte Transitsequenz kernkodierter, plastidärer Polypeptide. Sie ist sogar länger als das zugehörige PC-Strukturpolypeptid (ca. 10 kd). Die erste Transitsequenz eines LHC-Polypeptides wurde von Cashmore (1984) bei Erbse ermittelt. Sie zeigt keine nennenswerte Homologie zur SSU-Transitsequenz von Erbse und ist auch wesentlich kürzer (36-37 Aminosäuren des LHC-Transitpolypeptides zu 57 Aminosäuren des SSU-Transitpolypeptides). Die Vermutung, daß die Transitsequenz und das Strukturpolypeptid interagieren, wird außerdem durch Importuntersuchungen mit unterschiedlich modifizierten SSU-Vorstufen unterstützt. Eliminiert man etwa die Transitsequenz der SSU-Vorstufe enzymatisch, so findet kein Import des SSU-Strukturpolypeptides in isolierte Chloroplasten statt. Dies hat zuerst S.Bartlett im Labor von N.-H.Chua durch den Reimport importierter SSU gezeigt. Durch die Verwendung von Canavanin als Arginin-Analogon können in vitro abnorme SSU-Vorstufen synthetisiert werden. Sie werden ebenfalls nicht in Chloroplasten importiert und auch nicht prozessiert (Ellis und Robinson, 1984). Besonders die zuletzt genannte Untersuchung unterstreicht die Bedeutung der Argininreste in der Transitsequenz (s.o.). Auch zum Import kernkodierter, mitochondrieller Polypeptide existieren Untersuchungen, mit denen man den strukturellen und funktionelle Zusammenhang von Strukturpolypeptid, Transitsequenz und Mitochondrienmembranen zu erklären sucht. Bei Neurospora demonstrierten Hennig und Neupert (1981), daß in vitro synthetisierte, kernkodierte, mitochondrielle Polypeptidvorstufen an die äußere Mitochondrienmembran binden. Die Bindung der Polypeptidvorstufen kann verhindert werden, indem man die N-terminalen Verlängerun-

gen entfernt oder die Mitochondrienmembran kurz mit Trypsin (in niedrigen Konzentrationen) behandelt. Spezifische Rezeptoren für importierbare Polypeptidvorstufen sind bis heute noch nicht isoliert worden, aber es wurden bereits Kompetitionsexperimente durchgeführt, die vermuten lassen, daß für Polypeptide, die für unterschiedliche Mitochondrienkompartimente bestimmt sind, auch verschiedene Rezeptoren existieren (Zimmerman et al., 1981). Bei den kernkodierten, mitochondriellen Polypeptidvorstufen gibt es, wie bei den kernkodierten, plastidären Polypeptidvorstufen, Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Transitsequenz und Strukturpolypeptid. Das Proteolipid des ATP-Synthasekomplexes in Neurospora crassa besitzt eine Transitsequenz aus 66 Aminosäuren. Sie ist stark polar und insgesamt unter physiologischen Bedingungen positiv geladen (Viebrook et al., 1982). Es wird angenommen, daß diese N-terminale Verlängerung das extrem hydrophobe Strukturpolypeptid während der Passage durch das Cytoplasma (vom Ort der Synthese bis zum Mitochondrium) in einer löslichen Form hält. Die mitochondrielle Cytochrom c Peroxydase, die als Vorstufe ebenfalls im Cytoplasma synthetisiert wird, ist im Raum zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Das reife Polypeptid aus Hefe ist N-terminal um 68 Aminosäuren verlängert (Kaput et al., 1982). Die N-terminale Elongation ist auch hier insgesamt positiv geladen und enthält zu ca. 25% Alanin- und Serinreste. Der apolare Bereich durchzieht wahrscheinlich die innere Mitochondrienmembran, um einem prozessierenden Enzym in der äußeren Mitochondrienmatrix die Möglichkeit zur proteolytischen Spaltung der Vorstufe zu geben. Dabei entsteht ein Intermediat, das in einem zweiten enzymatisch katalysierten Schritt zum funktionellen Polypeptid ausreift. Die Transitpolypeptide aller SSU-Vorstufen enthalten in ihrem N-terminalen Sequenzbereich zahlreiche apolare Aminosäuren wie Alanin, Valin und Serin (vgl. Abb. 24). Gleiches gilt auch für die Transitsequenz der LHCP-Vorstufe von Erbse, besonders hinsichtlich der Serinreste (Cashmore, 1984). Für den Import kernkodierter, plastidärer Polypeptide könnte daraus folgen, daß die apolaren, N-terminalen Bereiche der Transitsequenzen in die Chloroplastenhülle eindringen und dadurch der Import der Polypeptide in das Organell und, gekoppelt daran, die Reifung der Vorstufen eingeleitet werden. Ellis und Robinson (1984) zeigten durch in vitro Importexperimente mit Jodacetat vorbehandelten SSU-Vorstufen und isolierten Chloroplasten von Erbse, daß der Import und die Reifung der SSU-Vorstufe (ca. 20 kd) vermutlich ein zweistufiger Prozess ist, bei dem ein SSU-Intermediat von etwa 18 kd entsteht (reife SSU ca. 14 kd). Sie konnten das Intermediat innerhalb des Chloroplasten nachweisen und schlossen daraus, daß der zweite Schritt der Reifung im Chloroplasten stattfindet und für den Import nicht erforderlich ist.

Die Aminosäuresequenzen der reifen SSU-Polypeptide sind von mehreren Organismen verschiedener Organisationsstufen bekannt. Zu diesen Organismen gehören die dikotylen Pflanzenspezies Glycine (Berry-Lowe et al., 1982), Pisum (Bedbrook et al., 1980; Cashmore et al., 1983; Coruzzi et al., 1983 und 1984), Petunia (Dunsmuir et al., 1983), Spinacia (Martin, 1979; vorliegende Arbeit), Nicotiana (Muller et al., 1983; Mazur et al., 1985), die monokotylen Pflanzenspezies Lemna (Stiekema et al., 1983) und Triticum (Broglie et al., 1983), die Grünalge Chlamydomonas (Schmidt et al., 1979) und die Cyanobakterien Anacystis (Schinozaki et al., 1983) und Anabaena (Nierzwicki-Bauer et al., 1984). Die Primärstrukturen der SSU-Polypeptide wurden entweder durch die Sequenzierung der Polypeptide ermittelt oder aus genomischen bzw. aus cDNA-Sequenzen abgeleitet. Die molekulare Organisation der entsprechenden nukleären Gene ist bis heute allerdings nur bei Glycine (Berry-Lowe et al., 1982), Pisum (Coruzzi et al., 1984), Nicotiana (Mazur et al., 1985), Triticum (Broglie et al., 1983) und Spinacia (vorliegende Arbeit) bekannt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von SSU-Strukturpolypeptiden verschiedener Pflanzenspezies (vgl. III.K.1. und Abb. 40) zeigt, daß der prozentuale Anteil positionsidentischer Aminosäuren innerhalb der Gruppe dikotyler Spezies (Pisum, Spinacia, Nicotiana und Glycine) mit knapp 60% am größten ist. Die Homologie nimmt rasch ab, wenn man in diesen Vergleich die SSU-Sequenzen monokotyler Pflanzenspezies (Lemna und Triticum) oder gar der Cyanobakterien Anabaena und Anacystis miteinbezieht. Die Homologie sinkt dann letztlich auf unter 40%.

Die tabellarische Anordnung der Aminosäuresequenzen der verschiedenen SSU-Strukturpolypeptide veranschaulicht jedoch, daß nicht alle Sequenzabschnitte gleichermaßen von Veränderungen betroffen sind (vgl. Abb. 40). Vielmehr exsistieren einige Bereiche, die in ihren Sequenzen nahezu unverändert sind. Diese konservierten Sequenzabschnitte umfassen beim SSU-Polypeptid die Aminosäuren 1-5 (I), 10-19 (II), 49-51 (III), 58-76 (IV), 102-106 (V) und 108-117 (VI). Selbst bei den Cyanobakterien Anabaena und Anacystis sind diese Sequenzbereiche teilweise konserviert. Folglich liegt die Vermutung nahe, daß die genannten Segmente von funktioneller Bedeutung für das SSU-Polypeptid sind. Eindeutige Aussagen darüber sind jedoch kaum möglich, da die Funktion des SSU-Polypeptides im Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase-Komplex nicht geklärt ist. Es wird jedoch angenommen, daß die Oligopeptiddomänen II, IV und V für die Bindung des SSU-Polypeptides an das LSU-Polypeptid bei der Bildung des Holoenzymes verant-

wortlich sind (Broglie et al., 1983). Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, daß in vitro synthetisierte SSU-Polypeptide von Spinat und Erbse in Chloroplasten beider Spezies importiert werden können und dort mit den homologen oder heterologen LSU-Polypeptiden Holoenzyme bilden (Chua und Schmidt, 1978). Die Bedeutung des konservierten Sequenzabschnittes I (Aminosäure 1-5 des Strukturpolypeptides) ist in Verbindung mit dem ebenfalls konservierten Sequenzabschnitt V des Transitpolypeptides zu sehen (vgl. Abb. 40 und 24). In der SSU-Vorstufe sind das Transit- und das Strukturpolypeptid über diese konservierten Segmente miteinander verknüpft. Sie umschließen das Dipeptid Cys-Met, das die potentielle Spaltstelle bei der Reifung der SSU-Vorstufe (pSSU) zum SSU-Polypeptid darstellt. Die enzymatische Spaltung der Vorstufe findet zwischen dem Cystein- und dem Methioninrest statt, wobei der Cysteinrest zum Transitpolypeptid, der Methioninrest hingegen zum Strukturpolypeptid gehört. Die Bedeutung der Aminosäure Cystein bei der proteolytischen Spaltung der SSU-Vorstufe kann durch die Verwendung des Cysteinanalogons Cystindihydroxamat demonstriert werden. Allgemein sind Aminoacylhydroxamate Inhibitoren für Proteasen, die Zink als Kofaktoren benötigen. Der Hydroxamatrest bindet dabei das Zinkatom, während der Aminoacylrest das katalytische Zentrum der Protease blokkiert (Nishino und Powers, 1978). Der inhibitorische Effekt hängt dabei von der Art des Aminoacylrestes ab. Hydroxamate, die Seryl-, Alanyl-, Threonyl-, Arginyl-, Methionyl-, Aspartyl- oder Lysylreste tragen, haben keinen inhibitorischen Einfluß auf die Protease von Pisum, die die SSU-Vorstufe beim Transport in den Chloroplasten prozessiert (Ellis und Robinson, 1984). Aus der Beobachtung, daß das Cystindihydroxamat die Protease von Pisum inhibierte, leitete man ab, daß das prozessierende, proteolytische Enzym den Cysteinrest erkennt und die Vorstufe zwischen dem Cystein- und dem folgenden Methioninrest spaltet. Die Tatsache, daß alle bekannten SSU-Transitsequenzen nur einen Cysteinrest enthalten, der außerdem in seiner Position konserviert ist, unterstützt diese Annahme. Darüber hinaus haben die Importuntersuchungen mit in vitro synthetisierten SSU-Vorstufen von Erbse und Spinat gezeigt, daß die Vorstufen in homologe und heterologe Chloroplasten importiert und dabei zu reifen Polypeptiden prozessiert werden (Chua und Schmidt, 1978).

Neben den beiden Aminosäuren Cystein und Methionin sind auch die übrigen Aminosäuren der Sequenzabschnitte I (Strukturpolypeptid) und V (Transitpolypeptid) stark konserviert, so daß anzunehmen ist, daß auch sie für die Spaltung der SSU-Vorstufe von Bedeutung sind. In allen SSU-Strukturpolypeptiden höherer Pflanzen

sind die ersten fünf Aminosäuren identisch, auch bei dem SSU-Polypeptid von Spinat, das von Martin (1979) sequenziert wurde. Das in meiner Arbeit gefundene SSU-Gen von Spinat stellt hierzu eine erste Ausnahme dar (vgl. Abb. 40). Sowohl aus der DNA-Sequenz des SSU-Genes, als auch aus der cDNA-Sequenz für SSU wurde eine Aminosäuresequenz abgeleitet, bei der die zweite Aminosäure, die zu dem konservierten Sequenzabschnitt I des Strukturpolypeptides gehört, Lysin(Lys) statt Glutamin (Gln) ist. Hier wurde die ungeladene Aminosäure Glutamin gegen die unter physiologischen Bedingungen positiv geladene Aminosäure Lysin (Lys) ausgetauscht.

Neben den Sequenzvergleichen zwischen SSU-Polypeptiden verschiedener Pflanzenspezies sind auch Untersuchungen zur Homologie zwischen SSU-Polypeptiden der gleichen Spezies möglich. Der Vergleich der Primärstrukturen der reifen SSU-Polypeptide von Nicotiana tabacum (Muller et al., 1983) und von Spinacia oleracea (Martin, 1979), die durch die Sequenzierung der reifen Polypeptide bekannt geworden sind, mit den Aminosäuresequenzen, die aus den entsprechenden DNA-Sequenzen der SSU-Gene von Nicotiana tabacum (Mazur et al., 1985) und Spinacia oleracea (vorliegende Arbeit) abgeleitet wurden, verdeutlicht, daß die SSU-Populationen dieser beiden Pflanzenspezies nicht homogen sind. Die Aminosäuresequenzen der reifen SSU-Polypeptide von Nicotiana tabacum unterscheiden sich in fünf Aminosäuren, so daß die Homologie ca. 96% beträgt. Wesentlich eindrucksvoller sind die Unterschiede zwischen den Sequenzen der reifen SSU-Polypeptide von Spinacia oleracea (vgl. Abb. 40 / Spinacia I (Martin, 1979), Spinacia II (aus vorliegender Arbeit)). Sie differieren in 33 von 123 Aminosäuren, woraus sich eine Homologie von nur 73% ergibt. Unter der Voraussetzung, daß die von Martin (1979) ermittelte Aminosäuresequenz des SSU-Strukturpolypeptides fehlerfrei ist, folgt aus dem Sequenzvergleich, daß die SSU-Polypeptide von Spinacia oleracea eine sehr heterogene Population von Polypeptiden darstellen müssen, die in ihren Aminosäuresequenzen ebenso stark divergieren können, wie die SSU-Polypeptide verschiedener Pflanzenspezies (s.o.). Die konservierten Segmente I-VI der reifen SSU-Polypeptide von Spinacia oleracea (vgl. Abb. 40) sind dabei in vier Aminosäurepositionen betroffen. In Segment I wurde die Aminosäure Glutamin (polar, ungeladen) gegen Lysin (polar, positiv geladen) und in Segment II die Aminosäure Lysin (polar, positiv geladen) gegen Arginin (polar, positiv geladen) ausgetauscht. Die konservierten Bereiche III, IV und V sind nicht verändert. Der Abschnitt VI hingegen ist von zwei Austauschen betroffen, wobei die Aminosäure Glutamin (polar, ungeladen) gegen Glutaminsäure (polar, negativ geladen) und

die Aminosäure Isoleucin (apolar) gegen Valin (apolar) ausgewechselt wurden. In allen konservierten Regionen wurden nur solche Aminosäuren ausgetauscht, die unter physiologischen Bedingungen vergleichbare Eigenschaften besitzen, so daß der Charakter der konservierten Abschnitte I, II und VI vermutlich erhalten bleibt. Die übrigen 29 Veränderungen in der Aminosäuresequenz betreffen nur solche Bereiche der Primärstruktur, die ohnehin zwischen den SSU-Polypeptiden der verschiedenen Pflanzenspezies sehr stark divergieren. Die relativ geringe Homologie (73%) zwischen den beiden SSU-Polypeptiden von Spinacia oleracea (Martin, 1979 und vorliegende Arbeit) ist zwar ungewöhnlich, aber unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Domänenstruktur beibehalten bleibt, erscheint die Divergenz weniger gravierend als zunächst angenommen wurde. Daß nicht konservierte Sequenzabschnitte, zumindest in bezug auf die Bindungsreaktion zwischen dem SSU-Polypeptid und dem LSU-Polypeptid nicht wesentlich sind, demonstrierten Experimente von Chua und Schmidt (1978). Sie stellten fest, daß die SSU-Polypeptide von Pisum und Spinacia (Homologie ca. 73%) mit den heterologen LSU-Polypeptiden hybride Holoenzyme zu bilden vermögen.

Die nukleären SSU-Gene sind, wie erwähnt, bis heute nur bei den höheren Pflanzen Glycine, Pisum, Nicotiana, Triticum und durch die vorliegende Arbeit auch bei Spinacia isoliert und charakterisiert worden. Bei allen genannten Spezies sind die SSU-Gene gespalten, das heißt, kodierende Sequenzen (Exons) sind durch nicht kodierende Abschnitte (Introns) unterbrochen. Gespaltene Gene sind für eukaryotische Viren und tierische, wie auch pflanzliche Organismen hinreichend bekannt. Beispiele hierfür sind das Ovalbumingen vom Huhn (Chambon et al., 1979), das Vitellogeningen von Xenopus (Ryffel et al., 1980), die Insulingene von Huhn (Perler et al., 1980) und Mensch (Bell et al., 1980) oder die Actingene in höheren Pflanzen (Shah et al., 1983). Eukaryotische Gene, die für Polypeptide kodieren, werden in vivo durch die Polymerase II transkribiert. Die Transkriptionseinheit umfaßt die kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen des Genes, einschließlich der Signale für die Initiation, Regulation und Termination der Transkription (Nevins, 1983). Die Transkription erfolgt kolinear, und das entstehende primäre Transkript wird in mehreren Schritten ko- und posttranskriptionell modifiziert (Darnell, 1982; Flint, 1981, Lewin, 1980a und 1980b; Sharp, 1981). Die Introntranskripte gespaltener Gene werden exzisiert und die mRNA an ihren Enden modifiziert. Alle Schritte der mRNA-Reifung finden bei zellulären

Genen vermutlich im Zellkern statt (Nevins, 1979; Piper, 1979). Die reife mRNA wird aus dem Zellkern ins Cytoplasma geschleußt und dort translatiert. Die meisten mRNA-Spezies eukaryotischer Zellen sind strukturell und funktionell monocistronisch. Strukturell polycistronische, funktionell monocistronische mRNA-Spezies, etwa des Tabakmosaikvirus (Hunter et al., 1976) oder des Polyomavirus (Smith et al., 1976) und funktionell dicistronische mRNA-Spezies des Herpes simplex Virus (Preston und McGeoch, 1981) stellen Ausnahmen dar.

Die molekulare Organisation der bekannten SSU-Gene ist zwischen den Pflanzenspezies Glycine, Pisum, Nicotiana, Triticum und Spinacia recht verschieden. Während das SSU-Gen der monokotylen Spezies Triticum aus zwei Exons aufgebaut ist, enthält das SSU-Gen der dikotylen Spezies Glycine, Pisum und Spinacia drei Exons. Bei Nicotiana ist die kodierende Sequenz sogar auf vier Exons aufgeteilt. Bei allen SSU-Genen kodiert das am weitesten in 5'-Richtung gelegene Exon 1 ausschließlich für die Transitsequenz und die ersten beiden Aminosäuren des Strukturpolypeptides. Das sich in 3'-Richtung anschließende Exon 2 umfaßt bei Triticum das gesamte Strukturpolypeptid (außer den beiden ersten Aminosäuren). Bei Glycine, Pisum, Nicotiana und Spinacia ist das Exon 2 von einheitlicher Länge. Es kodiert für die Aminosäuren 3-47 der jeweiligen Strukturpolypeptide. Das Intron 1 trennt bei allen Spezies das Exon 1 vom Exon 2. Seine Länge ist nicht einheitlich für die verschiedenen SSU-Gene. Sie reicht von 79 Nukleotiden bei Pisum bis zu 292 Nukleotiden bei Triticum. Das Exon 3 kodiert bei Pisum, Glycine und Spinacia für den Rest des Strukturpolypeptides (Aminosäure 48-123). Das Intron 2 zwischen Exon 2 und Exon 3 ist bei Pisum 86, bei Glycine 190 und bei Spinacia 99 Nukleotide lang. Bei Nicotiana sind die kodierenden Sequenzen für Aminosäure 48-123 auf zwei Exons (Exon 3 und Exon 4) verteilt. Exon 3 kodiert dabei für die Aminosäuren 48-65, wohingegen Exon 4 für den Rest des Strukturpolypeptides kodiert (Aminosäure 66-123). Das Intron 2 und das zusätzliche Intron 3 sind bei Nicotiana 156 und 145 Nukleotide lang. Zwischen den Introns der verschiedenen SSU-Gene existieren keine nennenswerten Homologien. Die Aminosäuren 54-65 des SSU-Strukturpolypeptides fehlen bei den Cyanobakterien Anabaena (vgl. Abb. 40) und Anacystis. Interessanterweise wird dieser Sequenzabschnitt bei Nicotiana gänzlich durch das kleine Exon 3 (Aminosäure 48-65) kodiert. Die Existenz des Exons 3 bei Nicotiana ist ungewöhnlich, da hierdurch der stark konservierte Sequenzabschnitt IV (Aminosäure 58-76) des Strukturpoly-

peptides (vgl. Abb. 40) auf zwei Exons (Exon 3 und Exon 4) verteilt wird. Vorausgesetzt, daß das Segment IV eine funktionelle Domäne des SSU-Strukturpolypeptides darstellt, steht die molekulare Organisation des SSU-Genes von Nicotiana teilweise im Gegensatz zur Hypothese von Gilbert (1979), wonach Exons funktionelle Domänen von Polypeptiden enthalten. Für die übrigen SSU-Gene ist die Hypothese zutreffend, denn die Transitpolypeptide werden durch Exon 1 kodiert und die postulierten Funktionseinheiten zur Bindung des SSU-Strukturpolypeptides an das LSU-Polypeptid sind bei Glycine, Pisum und Spinacia auf die Exons 2 und 3 verteilt.

Der genetische Kode gilt als "universell", das heißt er gilt gleichermaßen für alle Organismen von der niedrigsten bis zur höchsten Organisationsstufe. Eine Ausnahme bilden die Mitochondrien. In den Mitochondrien vieler Organismen differiert der benutzte Kode vom "universellen" Kode, und in verschiedenen Organismen werden verschiedene Varianten benutzt. Als Beispiel hierfür sei die Kodonnutzung in den Mitochondrien von Säugern und Pilzen erwähnt (Eperon et al.,1980). Die häufigste Abweichung vom "universellen" Kode ist die Verwendung des Tripletts UGA, das in allen Systemen als Stoppkodon die Translation terminiert und in Mitochondrien häufig für die Aminosäure Tryptophan kodiert. Dies trifft jedoch nicht für die Mitochondrien aller Organismen zu, denn in den Mitochondrien höherer Pflanzen gilt das Triplett UGA ebenfalls als Stoppkodon (Borst et al., 1984). Der genetische Kode ist degeneriert, da er mehr verschiedene Kodons (Tripletts) enthält als Aminosäuren zur Verfügung stehen. Nur die Aminosäuren Tryptophan und Methionin werden durch einfach vorhandene Tripletts kodiert. Die Degeneration liegt vornehmlich in der dritten Position der Kodons, die in äquivalenter Weise durch Cytosin und Uracil (Thymin) oder Guanin und Adenin besetzt sein kann. Die Häufigkeit der Verwendung einzelner Kodons für eine bestimmte Aminosäure kann jedoch zwischen verschiedenen Organismen und zwischen Genen eines Organismus variieren. Legt man die "Wobble-Hypothese" von Crick (1966) zugrunde, so benötigt ein Organismus wenigstens 32 verschiedene tRNA-Spezies, um alle Kodons zu übersetzen. Bei Spinacia oleracea konnten 27 plastidäre tRNA-Spezies für 16 Aminosäuren (Driesel et al., 1979) und bei Oenothera sp. sogar 37 plastidäre tRNA-Spezies für 13 Aminosäuren identifiziert werden (Tittgen, Diplomarbeit, 1981), so daß anzunehmen ist, daß bei beiden Organismen mehr als 32 tRNA-Spezies an plastidären Translationsprozessen beteiligt sind. Auch hierin

stellen Mitochondrien eine Ausnahme dar, denn man hat bei tierischen Mitochondrien nur 22 tRNA-Spezies gefunden, so daß man vermutet, daß die meisten dieser tRNA-Spezies jeweils vier statt zwei verwandte Kodons erkennen (Grivell, 1983; Borst et al., 1983). Innerhalb eines Organismus, z.B. in einer Pflanzenzelle, scheint die Kodonnutzung in den verschiedenen genetischen Kompartimente (Kern/Cytoplasma, Plastide, Mitochondrium) nicht zufällig zu erfolgen. So konnte für die ptDNA-kodierten LSU-Gene von Spinat und Mais (McIntosh et al., 1980; Zurawski et al., 1981) festgestellt werden, daß die Kodons CGG für Arginin (Arg) und ACG für Threonin (Thr) nicht verwendet werden. Die übrigen Kodons werden zwar alle benutzt, jedoch liegt die Präferenz in der nicht konservierten dritten Position der Tripletts eindeutig bei A und T. Ähnliche Ergebnisse werden für die plastidär kodierten Gene für Cytochrom f (Alt und Herrmann, 1984), Cytochrom b_6 (Heinemeyer et al., 1984), das 44kd-Chlorophyll a-Apoprotein (Alt et al., 1984), das 32kd-(ähnliche)-Polypeptid des Photosystem II-Reaktionszentrum (Alt et al., 1984), die Proteolipiduntereinheit der ATP-Synthase (Alt et al., 1983) und das 51kd-Polypeptid des Photosystem II-Reaktionszentrum (Morris und Herrmann, 1984) von Spinacia oleracea berichtet. Die Kodonnutzung ergab für alle Polypeptide eine präferenzielle Verwendung von A und T zu mehr als 70% in der dritten Position der kodierenden Tripletts. Außerdem wurde festgestellt, daß einige Kodons mit G oder C in der dritten Triplettposition nicht benutzt wurden (vgl. McIntosh et al., 1980 und Zurawski et al., 1981).

Durch die Sequenzierung des SSU-Genes und der cDNAs für PC, LHCP, SSU und das 34kd-Polypeptid von Spinat konnte die Kodonnutzung im Cytoplasma sowie zwischen den genetischen Kompartimente Plastide und Kern/Cytoplasma beurteilt werden. Aus den Sequenzierungsergebnissen geht hervor, daß im Kern/Cytoplasma-Kompartiment für die untersuchten Gene alle Kodons, außer CGC für Arginin (Arg) und CGG ebenfalls für Arginin, verwendet werden. Im Gegensatz zur Plastide, in der nur zu etwa 30% G und C (bzw. 70% A und T, s.o.) in der dritten Position der Kodons vorgefunden wurde, steigt im Kern/Cytoplasma-Kompartiment der Anteil von G und C in der äquivalenten Position auf etwa 60%. Das bedeutet zumindest, daß die Präferenz von A und T in der nicht konservierten Kodonposition, wie sie bei der Plastide festgestellt wurde, für das Kern/Cytoplasma-Kompartiment nicht gilt. Vergleicht man die Kodonnutzung in den beiden Kompartimenten nicht in ihrer Gesamtheit, sondern für einzelne Aminosäuren, so lassen sich Gemeinsamkeiten wie auch Unterschiede feststellen. Zu den Gemeinsamkeiten gehört die vor-

nehmliche Benutzung (zu ca. 70%) der Kodons GGA und GGT für Glycin (Gly) sowie der Kodons CCA und CCT für Prolin (Pro). Das bedeutet, daß diese Kodons in beiden Kompartimenten mit gleicher Häufigkeit benutzt werden. Für die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Asparagin (Asn) und Tyrosin (Tyr) ist die Kodonnutzung kompartimentspezifisch. Während in der Plastide für diese Aminosäuren teilweise mit mehr als 80%-iger Häufigkeit Kodons verwendet werden, die in der dritten Position auf A bzw. T enden, enthalten die Kodons, die im Kern/Cytoplasma-Kompartiment für diese Aminosäuren kodieren, zu mehr als 70% G bzw. C. Beispielsweise wird die Aminosäure Asparagin (Asn) in der Plastide präferenziell durch das Triplett AAT kodiert. Im Kern/Cytoplasma-Kompartiment hingegen wird für Asparagin vornehmlich das Kodon AAC verwendet. Bemerkenswert ist hierbei, daß diese Gruppe nur solche Aminosäuren enthält, für die jeweils nur zwei verwandte Kodons existieren. Für alle übrigen Aminosäuren, mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan, ist die Kodonnutzung im Kern/Cytoplasma-Kompartiment weniger selektiv, wobei in der dritten, nicht konservierten Position der Kodons mit etwa gleicher Häufigkeit A oder G bzw. T oder C vertreten sind. Die kompartimentspezifische Kodonnutzung für die oben genannten Aminosäuren ist jedoch nicht zwingend, denn sie kann bei verschiedenen Genen desselben Kompartimentes für die ein oder andere Aminosäure unterschiedlich sein. Beispielsweise erfolgt im Kern/Cytoplasma-Kompartiment für das LHCP-Gen von Spinat die Kodonnutzung für die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Tyrosin, Asparagin und Phenylalanin kompartimentspezifisch (s.o.). Gleiches gilt auch für das SSU-Gen von Spinat, mit Ausnahme der Kodonnutzung für die Glutaminsäure. Während beim LHCP-Gen, aber auch beim PC-Gen und beim 34kd-Gen (rudimentäre cDNA-Sequenzen), das Kodon GAG für die Glutaminsäure zu ca. 85% verwendet wird, werden im SSU-Gen die Kodons GAG und GAA mit gleicher Häufigkeit für die Glutaminsäure benutzt. Interessanterweise ist die Kodonnutzung selbst innerhalb des SSU-Gens von Spinat nicht über alle Sequenzabschnitte einheitlich. Während in Exon 1 und Exon 3 Kodons verwendet werden, bei denen in der dritten, nicht konservierten Position zwischen 60 und 70% G bzw. C vertreten sind, findet man beim Exon 2 in der entsprechenden Position der Kodons nur zu 40% G bzw. C vor. Die Tatsache, daß der genetische Kode degeneriert ist, und daß die Kodonnutzung in den genetischen Kompartimenten (Kern/Cytoplasma, Plastide, Mitochondrium) für einige Aminosäuren unterschiedlich, d.h. kompartimentspezifisch ist, legt die Vermutung nahe, daß sich hier evolutionäre Ereignisse widerspiegeln. Darüberhinaus könnte ein Zusammenhang zwischen Differenzierungsvorgängen und genspezifischer Kodonnutzung zu bestehen.

Das monocistronische Primärtranskript zellulärer, eukaryotischer Proteingene wird in vielfältiger Weise modifiziert, bevor es als reife mRNA den Zellkern verläßt und im Cytoplasma translatiert werden kann. Diese posttranskriptionellen Modifikationen betreffen mit sehr wenigen Ausnahmen alle eukaryotischen, zellulären mRNAs und werden in "splicing", "capping" und "tailing" unterteilt.

Beim "capping" wird der 5'-Terminus einer mRNA modifiziert. Dabei wird das 5'-terminale Nukleotid der mRNA über eine "Triphosphatbrücke" mit 7-Methyl-Guanosin (m^7G) verknüpft. Die Binding erfolgt zwischen den jeweiligen 5'C-Atomen der beiden Nukleotide (Shatkin, 1976; Lewin, 1980c; Filipowcz, 1978). Diese 5'-5'-Verknüpfung ist invers relativ zur 3'-5'-Phosphodiesterbindung, die normalerweise in Polynukleotidketten auftritt. Dadurch existiert am 5'-Ende der modifizierten mRNA weder eine freie 5'-Hydroxylgruppe, noch eine freie 5'-Phosphatgruppe. Die Addition des Nukleotides hat zweierlei Bedeutung. Erstens wird hierdurch die Bindung der 40S Ribosomenuntereinheit an die mRNA forciert (Banerjee, 1980; Shatkin, 1976), und zweitens ist die mRNA durch die Modifikation vor Degradationsprozessen an ihrem 5'-Ende geschützt (Furuichi et al., 1977; Moyer, 1981). Neben dem addierten 7-Methyl-Guanosin sind auch häufig die ersten beiden Nukleotide der mRNA (Position +1 und +2) methyliert. Das gilt besonders für die mRNAs höherer Eukaryoten (Shatkin, 1976). Diese zusätzlichen Methylierungen scheinen jedoch keinen Einfluß auf die mRNA-Funktion zu haben (Kaechler et al., 1979; Dimock und Stoltzfus, 1979). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß einzelne Nukleotide, teilweise auch Sequenzen der mRNA, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum addierten 7-Methyl-Guanosin befinden, konserviert sind. Das Nukleotid in der Position +1 der mRNA (s.o.) trägt fast immer ein Purin, meistens Adenin (Baker und Ziff, 1981; Shenk, 1981; Breathnach und Chambon, 1981). Das trifft auch für die potentiellen "cap"-Stellen der SSU-mRNAs von Weizen (Broglie et al., 1983), Erbse (Coruzzi et al., 1984), Sojabohne (Berry-Lowe et al., 1982) und Spinat (vorliegende Arbeit) zu, die aus den entsprechenden DNA-Sequenzen der SSU-Gene abgeleitet wurden.

Die posttranskriptionelle Modifikation der nicht kodierenden 3'-Regionen einer mRNA besteht in der enzymatischen Addition von Poly(A) an das 3'-Ende der mRNA ("tailing"). Der Poly(A)-Schwanz ist in der Regel 50-200 Nukleotide lang. Bei einigen mRNA-Spezies wurden aber auch schon Poly(A)-Verlängerungen von 1000 und mehr Nukleotiden gefunden (Kakidani et al., 1982). Die Polyadenylierung einer eukaryotischen mRNA ist jedoch nicht obligatorisch, denn es wurden schon eine

Reihe von zellulären und viralen mRNAs gefunden, die nicht polyadenyliert waren (Baralle, 1983). Ein bekanntes Beispiel hierfür sind die mRNAs der Histone. Die Modifizierung des Primärtranskriptes in seiner nicht kodierenden 3'-Region ist ein mehrstufiger Prozess. Der Polyadenylierung geht dabei die enzymatische Spaltung des Primärtranskriptes an der Polyadenylierungsstelle voraus, denn die Termination der Transkription findet nicht an der Polyadenylierungsstelle statt, sondern jenseits davon (in 3'-Richtung der Polyadenylierungsstelle). Die Termination der Transkription wurde für eukaryotische Gene bisher wenig untersucht und funktionelle Terminationssignale sind für pflanzliche Gene bisher nicht bekannt. Der Vergleich der nicht kodierenden 3'-Regionen eukaryotischer mRNAs verwandter Gene zeigt, daß diese Sequenzabschnitte mit wenigen Ausnahmen (Hennighausen et al., 1982) weitaus weniger konserviert sind, als die kodierenden Sequenzabschnitte (Efstratiadis et al., 1980; Jagodzinski et al., 1981; Poole et al., 1981; Michelson und Orkin, 1980). Die 3'-flankierenden Sequenzen können sogar bei mRNAs, die für das gleiche Polypeptid kodieren, sehr verschieden sein. Ein Beispiel dafür sind die mRNAs der Dihydrofolatreduktase aus Mauszellen, deren 3'-Regionen zwischen 80 und 930 Nukleotiden variieren (Setzer et al., 1980). Trotz der extremen Unterschiede existiert in den flankierenden 3'-Regionen eine konservierte Sequenz, nämlich das Hexanukleotid AAUAAA (AATAAA). Es liegt in der Regel 10-30 Nukleotide von der Polyadenylierungsstelle der mRNA entfernt (Prootfoot und Brownlee, 1976). Das Hexanukleotid ist vermutlich für die Spaltung des Primärtranskriptes an der Polyadenylierungsstelle von Bedeutung oder/ und dient als Erkennungssignal für die Poly(A)-Polymerase. Das SSU-Gen und die cDNA-Sequenzen für Plastocyanin, das LHC-Polypeptid, das 34kd-Polypeptid und die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase von Spinat besitzen dieses Hexanukleotid nicht. Jedoch existieren in der Entfernung von 10-30 Nukleotiden von der Polyadenylierungsstelle bei allen cDNA-Sequenzen Hexanukleotide, die sich in höchstens einem Nukleotid von der Sequenz AATAAA unterscheiden und somit als potentielle Polyadenylierungssignale eingestuft werden können (vgl. III.K.2.). Für das SSU-Gen von Spinat existieren mehrere potentielle Polyadenylierungssignale. Abweichungen von der Sequenz nach Proodfoot und Brownlee wurden bereits bei zahlreichen Genen festgestellt, z.B. beim Lysozymgen des Huhns (Jung et al., 1980), beim α-Amylasegen aus dem Pankreas der Maus (Tosi et al., 1981) oder auch beim SSU-Gen von Erbse (Coruzzi et al., 1984) und beim LHCP-Gen von Erbse (Cashmore, 1984).

Bei der Reifung der mRNA unterbrochener Gene werden die Intronteile aus dem Primärtranskript exzisiert, während die Exonteile miteinander verknüpft werden, so daß eine reife mRNA mit nicht unterbrochenem Leseraster entsteht (Flint, 1981; Lewin, 1980a und 1980b; Darnell, 1982; Sharp, 1981). Dieser Prozeß ("splicing") muß äußerst präzise verlaufen und sehr spezifisch sein. Aus vergleichenden Untersuchungen von Breathnach und Chambon (1981) ist die GT/AG-Regel bekannt, wobei jedes Intron 5'-terminal mit GT beginnt und 3'-terminal auf AG endet. Der Vergleich von mehr als 100 Exon/Intron- (Donorseite) und Intro/Exon-Verbindungsstellen (Akzeptorseite) zeigt, daß auch die nähere Umgebung von GT und AG konserviert ist (Breathnach und Chambon, 1981; Mount, 1982; Gallwitz et al., 1981) Ein Vergleich der Konsensussequenzen für Donor- bzw. Akzeptorseite nach Breathnach und Chambon (1981) mit den entsprechenden Exon/Intron- (Donorseite) bzw. Intron/Exon-Verbindungsstellen (Akzeptorseite) im SSU-Gen von Spinat zeigt für die Donorseiten Exon1/Intron1 bzw. Exon2/Intron2 jeweils 78% Homologie. Bei den Akzeptorseiten Intron1/Exon2 bzw. Intron2/Exon3 beträgt die Homologie zur entsprechenden Konsensussequenz nach Breathnach und Chambon (1981) 73% bzw. 64% (vgl. Tabelle XI).

Promotoren werden als Regionen auf der DNA charakterisiert, die unerläßlich für die Bindung der RNA-Polymerase und die spezifische Initiation der Transkription sind. In Prokaryoten enthalten sie homologe Bereiche der Sequenz 5'-TATAATG-3' ("Pribnow box") und liegen auf dem Gen 10 Nukleotide (Position -10) vom mRNA-Startpunkt (Position +1) entfernt (Pribnow, 1979; Rosenberg und Court, 1979; Siebenlist et al., 1980). Ein zweiter homologer Bereich ist die Erkennungsregion für die RNA-Polymerase. Er liegt ca. 35 Nukleotide (Position -35) vom Startpunkt der mRNA entfernt (Rosenberg und Court, 1979; Siebenlist et al., 1980).

In Eukaryoten exsistiert als Äquivatent zur "Pribnow box" die TATA-Sequenz (Goldberg, 1979), die jedoch 25-35 Nukleotide (Position -25 bis -35) vom Startpunkt der mRNA (Position +1) entfernt ist. Das 5'-terminale T der Sequenz 5'-TATA-3' liegt im allgemeinen zwischen Position -26 und -34. In der unmittelbaren Umgebung der TATA-Sequenz existieren kaum Homologien zwischen verschiedenen Genen, mit Ausnahme einer gewissen Präferenz für G. Ein zweiter homologer Bereich der Sequenz 5'-GG$\underset{T}{C}$CAATCT-3' wurde bei mehreren zellulären und viralen Proteingenen gefunden. Er ist bei diesen Genen 70-80 Nukleotide vom mRNA-Startpunkt entfernt, d.h. in Position -70 bis -80 (Efstratiadis et al., 1980; Benoist et al., 1980).

Die Funktion dieser CAAT-Region ist nicht genau bekannt und ihre generelle Existenz in eukaryotischen Genen muß noch erst bewiesen werden. Man nimmt an, daß ihre Funktion als regulatorisches Element im Zusammenhang zur Transkriptionsquantität zu suchen ist.

Im SSU-Gen von Spinat treten zwei Sequenzabschnitte auf, die mit der TATA-Region und der CAAT-Region verglichen werden können (Abb. 39). Die TATA-Sequenz I ist in Position -28 bis -31 vom potentiellen Startpunkt der mRNA (Position +1) gelegen. Sie besitzt sowohl die richtige Distanz, als auch die richtige Orientierung zum mRNA-Startpunkt (in 5'-Richtung von Position +1). Ihre Homologie zur Konsensussequenz 5'- G-GTATA$^{A}_{T}A^{A}_{T}$-G--G -3' (Breathnach und Chambon, 1981) beträgt ca. 73% (vgl. Tabelle XV). Die TATA-Sequenz II des SSU-Genes von Spinat besitzt nur etwa 64% Homologie zur Konsensussequenz. Sowohl ihre Position (+24 bis +27), als auch ihre Orientierung zum potentiellen Startpunkt der mRNA (in 3'-Richtung von Position +1) sind ungewöhnlich. Äquivalente Bereiche zu der CAAT-Region, in korrekter Orientierung zum Startpunkt der mRNA (beide liegen in 5'-Richtung von Position +1), finden sich von Position -78 bis -81 (CAAT-Sequenz I) und von Position -85 bis -88 (CAAT-Sequenz II). Beide Bereiche unterscheiden sich jedoch in ihrer Homologie zur Konsensussequenz der CAAT-Region (5'- GG$^{C}_{T}$CAATCT -3') nach Breathnach und Chambon (1981). Die CAAT-Sequenz I weist etwa 67% Homologie auf, wohingegen die CAAT-Sequenz II nur zu ca. 45% homolog ist. In beiden Motiven sind die zentralen Nukleotide der Konsensussequenz nicht vollständig vorhanden (vgl. Tabelle XVII). In den CAAT-Sequenzen I und II sind nur die zentralen Nukleotide AA bzw. CAA vorhanden. Bei den SSU-Genen von Erbse (Coruzzi et al., 1984) und Weizen (Brooglie et al., 1983) ist das zentrale Element der CAAT-Region ebenfalls CAA. Nur bei den SSU-Genen von Tabak (Mazur et al., 1985) und Sojabohne (Berry-Lowe et al., 1982) ist die Sequenz 5'-CAAT-3' vorhanden. Allerdings ist in keinem der genannten Gene die Homologie zur Konsensussequenz nach Breathnach und Chambon (1981) größer als 67%.

Die Regulation der Transkription eukaryotischer Gene ist außerordentlich komplex. Sie schließt sowohl die Regulation der RNA-Polymeraseaktivität, als auch Veränderungen in der Struktur des Chromatins und den Einfluß interner, wie auch externer Faktoren ein. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nur wenig über die Regulation der Genexpression bei Pflanzen bekannt. Man weiß zwar, daß in Pflanzen

die Genexpression entwicklungsspezifisch und gewebespezifisch sein kann und man kennt auch Faktoren, die hier eine Rolle spielen, zum Beispiel Licht und Phytohormone, aber die Reaktionsmechanismen sind gänzlich unbekannt. Man weiß seit langem, daß die Akkumulation der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase durch Licht stimuliert wird (Graham et al., 1968), und daß der Einfluß des Lichtes durch das Phytochromsystem vermittelt wird (Filner und Klein, 1968). Spätere Untersuchungen haben dann gezeigt, daß das Phytochrom die Expression der Gene für das SSU- und das LSU-Polypeptid kontrolliert (Jenkins et al., 1983). Darüberhinaus konnte festgestellt werden, daß die Menge translatierbarer mRNA für das SSU-Polypeptid in Pflanzen, die im Licht heranwuchsen, größer war, als in Pflanzen, die im Dunkel kultiviert worden waren (Bedbrook et al., 1980; Sasaki et al., 1981; Tobin und Suttie, 1980). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam man auch für das Chlorophyll a/b-bindende Polypeptid des Antennenkomplexes (Apel, 1979). Umgekehrt sind dagegen die Verhältnisse für die NADPH-Protochlorophyllidreduktase, für die ein Abfall ihrer mRNA-Konzentration unter dem Einfluß des Lichtes festgestellt wurde (Apel, 1981). Mittlerweile gibt es Hinweise, daß der Wirkort des Phytochroms bei der Regulation der Expression der SSU- und LHCP-Gene der Zellkern ist, und daß das Phytochrom wahrscheinlich direkten Einfluß auf die Transkription nehmen kann. Der molekulare Mechanismus der Phytochromregulation ist jedoch bis heute unbekannt.

In jüngerer Zeit wurden von Morelli et al. (1985) Experimente mit einem SSU-Gen von Erbse durchgeführt, die die Vermutung nahelegen, daß im 5'-Bereich des Gees Sequenzen existieren , die in die lichtregulierte Genexpression involviert sind. Für diese Experimente verwendeten die Autoren ein SSU-Gen von Erbse, dessen DNA-Sequenz bereits ermittelt worden war (Coruzzi et al., 1984). Sie transferierten das Gen zunächst mittels Ti-Vektor in Zellen von Petunia (Frayley et al., 1983) und demonstrierten, daß das SSU-Gen von Erbse in diesem heterologen System vom eigenen Promotor aus transkribiert wurde (Broglie et al., 1984). Darüberhinaus war das Niveau der mRNA für die SSU von Erbse in den Kalli von Petunia durch Licht reguliert. Damit war sichergestellt, daß das heterologe Petunia-System benutzt werden konnte, um die regulatorischen Sequenzen des SSU-Genes von Erbse zu charakterisieren. Es ist bekannt, daß in den meisten tierischen Genen, die durch die Polymerase II transkribiert werden, regulatorische Sequenzen in 5'-Richtung des mRNA-Startpunktes lokalisiert sind (Breathnach und Chambon, 1981). Daher vermuteten die Autoren, daß Sequenzen, die möglicherweise in die lichtregulierte Expression des SSU-Genes involviert sind, im 5'-Bereich des

Genes zu suchen sind. Sie kreierten eine Reihe verschiedener Deletionsmutanten des SSU-Genes von Erbse, die sich in den Längen ihrer flankierenden, nicht transkribierten 5'-Regionen unterschieden. Die Längen der nicht transkribierten 5'-Regionen variierten von 13 bis 1052 bp. Die 5'-Deletionsmutanten wurden dann via Ti-Plasmid (Agrobakterium tumefaciens) in Zellen von Petunia transferiert. Morelli et al. stellten fest, daß bis auf eine Ausnahme die Expression aller modifizierten SSU-Gene durch Licht induziert werden konnte. Das SSU-Gen, dessen Expression durch Licht nicht induzierbar war, besaß die kürzeste, nicht transkribierte 5'-Region von 13 Nukleotiden. Die Expression des SSU-Genes mit der nächst größeren nicht transkribierten 5'-Region (35 Nukleotide) war bereits durch Licht induzierbar. Daraus folgte, daß mögliche Kontrollsequenzen der lichtregulierten Genexpression beim SSU-Gen von Erbse zwischen den Nukleotiden +1 (Startpunkt der mRNA) und -35 lokalisiert sein mußten. Aus dem Vergleich dieser Regionen verschiedener SSU-Gene, vornehmlich von Mitgliedern der SSU-Genfamilie von Pisum sativum, leiteten Morelli et al. die Konsensussequenz 5'- CATTATATATAG$^{C}_{A}$ -3' ab. Die Konsensussequenz umfaßt die bekannte TATA-Region, die funktionell in die exakte Lokalisation des mRNA-Startpunktes involviert ist. Der Sequenzvergleich zwischen entsprechenden Regionen der SSU-Gene von Erbse, Tabak, Sojabohne, Spinat (TATA-Sequenz I) und der Konsensussequenz nach Morelli et al. (1984) zeigt eine überaus starke Homologie von 92% (Tabelle XVI). Selbst zum entsprechenden Sequenzabschnitt vom Weizen beträgt die Homologie noch 75%. Nur die zusätzliche TATA-Sequenz II des SSU-Genes von Spinat stellt eine Ausnahme dar. Sie ist mit 38% zur Konsensussequenz nach Morelli et al. (1985) weniger homolog als zur Konsensussequenz für TATA-Regionen nach Breathnach und Chambon (1981). Hier beträgt die Homologie 64%. Die mögliche Bedeutung der TATA-Region im Zusammenhang mit der lichtregulierten Genexpression läßt sich durch eine Vergleich der Konsensussequenz nach Morelli et al. (1985) mit der Sequenz der TATA-Region des LHCP-Genes von Erbse (Cashmore, 1984) unterstreichen, denn die Expression der LHCP-Gene wird wie die der SSU-Gene durch Licht induziert (s.o.). Die TATA-Region des LHCP-Genes von Erbse (5'- CATTATAAATACA -3') ist zu 85% zur Konsensussequenz 5'- CATTATATATAG$^{C}_{A}$ -3' nach Morelli et al. (1985) homolog, obwohl die TATA-Regionen verschiedener Gene im allgemeinen über die Sequenz 5'-TATA-3' hinaus kaum konserviert sind.

Die Expression der SSU-Gene wird nicht nur entwicklungsspezifisch und gewebespezifisch induziert, sondern auch in quantitativer Hinsicht reguliert. Da die Expression wahrscheinlich vor allem auf der Ebene der Transkription reguliert

wird, sollen Vergleiche zu anderen Genen vorgenommen werden, deren Expression nachweislich transkriptionell reguliert wird. Bei zahlreichen viralen (Banerji et al., 1981; de Villiers und Schaffner, 1981; Lusky et al., 1983; Laimins et al., 1982; Lang et al., 1984; Luciw et al., 1983) und einigen tierischen Genen (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983 und 1984; Picard und Schaffner, 1984; Walker et al., 1983) hat man DNA-Segmente gefunden, die die Expression benachbarter Gene verstärken ("Enhancer"). Die ersten Hinweise auf solche regulatorischen Elemente kamen von Grosschedl und Birnstiel (1980). Die Autoren stellten fest, daß die Transkriptionsrate eines Histongenes (H2A) des Seeigels durch ein DNA-Segment beeinflußt wurde, das in 5'-Richtung vom Gen lokalisiert war. Wenig später wurden im Genom des SV40 (Benoist und Chambon, 1981; Gruss et al., 1981) und des Polyomavirus (Tyndall et al., 1981) DNA-Segmente identifiziert, die die Transkription bestimmter Gene stimulieren. Beim SV40 stellte man fest, daß drei verschiedene DNA-Regionen für die Expression der Virusgene, die in den frühen Entwicklungsphasen des Virus aktiv sind, von Bedeutung sind. Dazu gehörten die TATA-Region, die für die exakte Lokalisation des mRNA-Startpunktes mitverantwortlich ist (Benoist und Chambon, 1981; Mathis und Chambon, 1981; Wasylyk et al., 1983), außerdem drei GC-reiche, 21 bp lange Segmente, die hintereinander liegen (Benoist und Chambon, 1981; Everett et al., 1983) und das "Enhancer"-Element, das aus zwei 72 bp langen, identischen Segmenten besteht, die mit gleicher Polarität aufeinander folgend angeordnet sind. Die Deletion eines der beiden 72 bp langen DNA-Segmente hat keinen Einfluß auf die Genexpression, wohingegen die Deletion beider DNA-Segmente, d.h. des gesamten "Enhancer"-Elementes, zu einer drastischen Reduktion der Transkriptionseffizienz der entsprechenden Gene führt (Benoist und Chambon, 1981; Wasylyk et al., 1983; Gruss et al., 1981; Fromm und Berg, 1982; Banerji et al., 1981). "Enhancer"-Elemente wirken nicht nur in Verbindung mit homologen, sondern auch mit heterologen Promotoren (Gillies et al., 1983; Banerji et al., 1983; Mercola et al., 1983). Beispielsweise verstärkte ein "Enhancer"-Element aus dem Genom des Polyomavirus, das in vitro mit einem ß-Globingen des Kaninchens verknüpft worden war, die Expression dieses Genes in transformierten HeLa-Zellen des Menschen (de Villiers und Schaffner, 1981). Der Effekt war unabhängig von der Orientierung des Polyoma-Fragmentes zur Transkriptionsrichtung des ß-Globingenes. Darüberhinaus nahm das "Enhancer"-Element des Polyomavirus über eine Entfernung von etwa 1400 bp (Abstand zwischen dem "Enhancer"-Element und dem Startpunkt der Globin-mRNA) Einfluß auf die Expression des Genes. Der Me-

nismus der verstärkten Genexpression, an der "Enhancer"-Elemente beteiligt sind, ist bis heute unbekannt. Man hat aber festgestellt, daß unter dem Einfluß eines "Enhancer"-Elementes die Konzentration an RNA-Polymerase im Bereich des mit ihm funktionell verknüpften Genes ansteigt. Daher wird vermutet, daß "Enhancer"-Elemente die Rate der Transkriptionsinitiation beeinflussen, ohne dabei die Spezifität der Initiation zu verändern (Weber und Schaffner, 1985).

Ein Vergleich der DNA-Sequenzen potentieller "Enhancer"-Elemente viraler und zellulärer Gene zeigt, daß sie sehr verschieden sind und kaum homologe Bereiche enthalten. Daher ist auch nicht bekannt, welche Sequenzbereiche eines "Enhancer"-Elementes für seine Funktion verantwortlich sind. Weiher et al. (1983) leiteten dennoch die Sequenz 5'- GTGG$^{TTT}_{AAA}$G -3' ab, die in den "Enhancer"-Elementen der meisten viralen Gene und auch beim zellulären Immunglobulingen (IgC_μ) der Maus auftritt (Gillies et al., 1983). Das "Enhancer"-Element dieses IgC_μ-Genes weist neben Sequenzabschnitten, die zur Konsensussequenz nach Weiher et al. homolog sind, auch gewisse strukturelle Ähnlichkeit zur analogen Region viraler Gene auf. Darüber hinaus ist die Fuktionalität des IgC_μ-"Enhancers" auch experimentell abgesichert (Gillies et al., 1983; Banerji et al., 1983; Mercola et al., 1983). Aus diesen Gründen wurde der IgC_μ-"Enhancer" zum Vergleich mit entsprechenden Regionen des SSU-Genes von Spinat herangezogen (vgl. Abb. 43).

Das essentielle Segment des IgC_μ-"Enhancers" ist 60 bp lang und im Intronbereich des IgC_μ-Genes lokalisiert. Es liegt 430 Nukleotide vom Startpunkt der mRNA entfernt. Das Segment enthält die Sequenzen 5'- GTGGTTTG -3' (II) und 5'- GTGGTTTT -3' (III), die zur Konsensussequenz nach Weiher et al. (1983) 100% bzw. 88% homolog sind und mit gleicher Polarität hintereinander angeordnet sind, aber durch 5 Nukleotide voneinander getrennt werden (vgl. Abb. 43). Außerdem exsistiert in 5'-Richtung von Bereich II und III die Sequenz 5'- AAAACCAC -3', die als Bereich I zu den beiden anderen Bereichen eine komplementäre Sequenz besitzt und invers angeordnet ist. Der Abstand zwischen Bereich I und II beträgt 17 Nukleotide.

Das SSU-Gen von Spinat enthält in seiner 5'-Region (Pos. -296 bis +77) drei Sequenzabschnitte (SSU1, SSU2, SSU3), die mit dem beschriebenen essentiellen Segment des IgC_μ-"Enhancers" verglichen werden können (Abb. 39 und 43). Bei der Gegenüberstellung der Sequenzen wurde darauf geachtet, daß die Homologie zwischen ihnen möglichst groß ist, und daß die Bereiche I, II und III des IgC_μ-"Enhan-

cers" in den Segmenten SSU1, SSU2 und SSU3 in vergleichbaren Positionen und mit gleicher Polarität auftreten. Zusätzlich wurde in den Sequenzvergleich ein entsprechendes Segment (SSUE) aus dem SSU-Gen von Erbse einbezogen (Coruzzi et al., 1984). Die Homologie zwischen dem IgC_{μ}-Segment (Pos. +458 bis +486) und den Segmenten SSU1 (Pos. -223 bis -195), SSU2 (Pos. -125 bis -98), SSU3 (Pos. +49 bis +77) und SSUE (Pos. -148 und -116) beträgt 45, 72, 52 und 55%. In den genannten Abschnitten ist die Konsensussequenz 5'- $GTGG^{TTT}_{AAA}G$ -3' nach Weiher et al. (1983) nur teilweise erhalten (vgl. Bereich II und III). Für den Bereich II der aufgeführten SSU-Sequenzen liegt die Homologie zur Konsensussequenz zwischen 63% für SSU2 und 88% für SSUE. Demgegenüber beträgt die Homologie zur Konsensussequenz im Bereich III nur 50% für SSU1 und SSU3, aber 75% für SSUE und 88% für SSU2. Ein ähnlicher Vergleich läßt sich auch für die Segmente SSU1 und SSU2 (Pos. -296 bis -286), SSU3 (Pos. -156 bis -146) und SSUE (Pos. -179 bis -169) anstellen. Die Homologie zum entsprechenden Sequenzabschnitt des IgC_{μ}-Segmentes (Pos. +430 bis +440) beträgt für SSU1, SSU2 und SSU3 jeweils 64% und für SSUE etwa 73%. Diese Bereiche I aller SSU-Segmente und des IgC-Segmentes enthalten Sequenzabschnitte, die mit der Konsensussequenz 5'- $C^{AAA}_{TTT}CCAC$ -3' verglichen werden können. Die entsprechenden Sequenzabschnitte zeigen für alle SSU-Segmente 75% Homologie zur Konsensussequenz (vgl. Abb. 43). Im IgC_{μ}-Segment sind die Bereiche I und II durch 17 Nukleotide voneinander getrennt. Dagegen ist der Abstand der Bereiche I und II bei SSU1, SSU2, SSU3 und SSUE mit 61, 160, 193 und 19 Nukleotiden meist wesentlich größer als im IgC_{μ}-Segment.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle aufgeführten SSU-Segmente von Spinat sowie das Segment SSUE von Erbse, zum essentiellen Segment des IgC_{μ}-"Enhancers" und den Konsensussequenzen 5'- $GTGG^{TTT}_{AAA}G$ -3' und 5'- $C^{AAA}_{TTT}CCAC$ -3' verhältnismäßig stark homolog sind, wenn man berücksichtigt, daß die SSU-Gene in keinerlei Weise mit dem IgC_{μ}-Gen verwandt sind und sie zudem aus Organismen mit unterschiedlichen Organisationsformen stammen. Besonders eindrucksvoll ist die Homologie zwischen dem SSU2-Segment und dem IgC_{μ}-Segment. Sie beträgt über das gesamte Segment, mit Ausnahme des mittleren Abschnittes (Pos. -125 bis -286), etwa 70%. Außerdem sind im SSU2-Segment die Bereiche I und II in 3'- bzw. in 5'-Richtung durch die Hexamere 5'- CACACA -3' bzw. 5'- TGTGTG -3' flankiert. Für solche Sequenzen, in denen Purin- und Pyrimidinreste alternierend auftreten und die außerdem invers zueinander angeordnet sind, wird vermutet, daß sie an der Regulation der Genexpression durch Bildung von Z-DNA beteiligt sind (Rich, 1982).

Das aus der Lambda-Klonbank von Spinat isolierte nukleäre DNA-Fragment, das das gesamte SSU-Gen, einschließlich seiner nicht kodierenden, flankierenden 3'- und 5'-Regionen enthielt, wurde zur Hybridisierung gegen HindIII-restringierte Kern-DNA von Spinat verwendet. Es ergab ein recht komplexes Hybridisationsmuster mit Signalen zwischen ca. 3,8 und 20,0 kb (vgl. Tabelle XIX). Insgesamt konnten 12 Signale unterschieden werden. Das Ergebnis macht deutlich, daß bei Spinacia oleracea mehrere SSU-Gene pro Genom exsistieren müssen, die zudem verschieden sind und an unterschiedlichen Stellen im Genom lokalisiert sein müssen. Solche SSU-Genfamilien wurden mit der gleichen Methode auch bei Triticum (Broglie et al., 1983), Pisum (Coruzzi et al., 1983), Glycine (Berry-Lowe et al., 1982) und Petunia (Dunsmuir et al., 1983) nachgewiesen. Die Hybridisationsergebnisse bei Spinat geben keinen Aufschluß über die genaue Anzahl der SSU-Gene oder die Art ihrer Verwandtschaft. Es wird zu prüfen sein, ob sich die SSU-Gene in ihren Intronsequenzen, in ihren nicht kodierenden 3'- und 5'-Regionen oder gar in ihren kodierenden Sequenzen unterscheiden und ob alle oder nur einzelne Mitglieder der SSU-Familien exprimiert werden. Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den SSU-Genen lassen sich am besten durch den direkten Vergleich der DNA-Sequenzen ermitteln.

Der Vergleich zwischen der SSU-cDNA und der entsprechenden Region auf dem SSU-Gen zeigt hinsichtlich der Nukleotidsequenzen (Abb. 42), wie der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Abb. 24), Gemeinsamkeiten und Unterschiede. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz für das Transitpolypeptid zwischen dem SSU-Gen und der SSU-cDNA von Spinat lassen vermuten, daß die Sequenzen verschiedene Mitglieder der SSU-Genfamilie repräsentieren. Im Bereich, der für das Transitpolypeptid kodiert, differieren das SSU-Gen und die cDNA nämlich in 6 Nukleotiden. Diese Austausche führen bis auf eine Ausnahme zu Änderungen in der Aminosäuresequenz. Hiervon sind die Aminosäuren in Position 23 (von Thr nach Met), Position 25 (von Gly nach Ala), Position 28 (von Gly nach Thr) und Position 38 (von Val nach Ala) betroffen (Abb. 24). Nur die Aminosäuren Gly bzw. Ala in Position 25 gehören zu einem konservierten Sequenzabschnitt. Die aus dem SSU-Gen von Spinat abgeleitete Transitsequenz enthält an dieser Position Gly, während alle anderen bekannten SSU-Transitpolypeptide (Lemna stellt hierin eine Ausnahme dar) einschließlich der, die aus der SSU-cDNA von Spinat abgeleitet wurde, in dieser Position mit Ala besetzt sind. Erstaunlich ist die Tatsache, daß die nicht kodierenden 5'-Regionen beider Vertreter fast identisch sind. Hier scheinen die nicht kodierenden Bereiche relativ stärker konserviert, als die kodierenden Se-

quenzen. Die nicht kodierenden 5'-Region des SSU-Genes und der entsprechende Abschnitt der SSU-cDNA unterscheiden sich nur dadurch, daß der cDNA gegenüber der genomischen Sequenz das Motiv 5'-GAGTAAGT-3' (Position +60 bis +67) fehlt, und daß in benachbarter Position (+69) C und A ausgetauscht wurden (vgl. Abb. 42). Die Tatsache, daß diese Sequenzabschnitte fast identisch sind, ist deshalb bemerkenswert, weil im allgemeinen die nicht kodierenden 5'-Regionen eukaryotischer mRNAs sowohl in ihrer Länge, als auch in ihrer Sequenz enorm variieren. Sogar zwischen verwandten Genen, die in ihren kodierenden Sequenzen stark konserviert sind, wurden erhebliche Unterschiede in den nicht kodierenden Regionen ihrer mRNAs festgestellt (Chin et al., 1981; Choe et al., 1982; Karin und Richards, 1982; McKeown und Firtel, 1981a; Montgommery et al., 1980). Die Translatierbarkeit einer gegebenen mRNA scheint allerdings durch Rekombinationen, Insertionen oder Deletionen (evtl. Segment 5'-GAGTAAGT-3') nicht beeinträchtigt zu sein (Sonenberg et al., 1980; Spencer et al., 1981). Die 17 Mitglieder der Actin-Genfamilie von Dictyostelium bilden Subfamilien auf der Basis homologer Abschnitte in den nicht kodierenden 5'-Regionen. Die Gene dieser Subfamilien werden während der Entwicklung des Organismus auch differentiell exprimiert (McKeown und Firtel, 1981a und 1981b). Vielleicht trifft beides auch auf die SSU-Gene von Spinat zu.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß das SSU-Gen von Spinat, verglichen mit den SSU-Genen von Pisum (Coruzzi et al., 1984), Glycine (Berry-Lowe et al., 1982), Triticum (Broglie et al., 1983) und Nicotiana (Mazur et al., 1985) folgende Besonderheiten besitzt :

1. Die Homologie zwischen der Aminosäuresequenz des SSU-Strukturpolypeptides von Spinacia oleracea, die aus der genomischen DNA-Sequenz abgeleitet wurde (vorliegende Arbeit) und der Aminosäuresequenz die durch die Sequenzierung des reifen SSU-Polypeptides ermittelt wurde (Martin, 1979), beträgt nur ca. 72% (vgl. III.K.1.). Eine vergleichbare Untersuchung bei Nicotiana tabacum ergab eine Homologie von etwa 96% (Mazur et al., 1985).

2. Die Aminosäure in Position 2 (vom N-Terminus aus) der Sequenz aller bekannten SSU-Strukturpolypeptide höherer Pflanzen ist Glutamin (Gln). Sie gehört

zu dem stark konservierten Sequenzabschnitt I, der die Aminosäuren 1-5 des Strukturpolypeptides umfaßt (vgl. Abb. 40). Im Unterschied zu anderen Spezies enthält das SSU-Strukturpolypeptid von Spinacia oleracea, dessen Aminosäuresequenz aus der genomischen DNA-Sequenz abgeleitet wurde (Klon λSonSSU), in dieser Position der Sequenz die Aminosäure Lysin (Lys) statt Glutamin (Gln). Dieses Ergebnis bestätigt sich durch die Untersuchung der cDNA-Sequenz des Klons pSocSSU (vgl. Abb. 24). Dieser Unterschied zu den SSU-Strukturpolypeptiden anderer Pflanzenspezies ist deshalb bemerkenswert, weil, wie bereits erwähnt, die ersten 5 Aminosäuren des Strukturpolypeptides als extrem konserviert gelten und weil die Aminosäuresequenz, die von Martin (1979) durch die Sequenzierung des Polypeptides von Spinacia oleracea ermittelt worden war, an der entsprechenden Stelle der Sequenz wie alle anderen SSU-Strukturpolypeptide die Aminosäure Glutamin trägt.

3. In der nicht transkribierten 5'-Region des SSU-Genes von Spinat liegt in 5'-Richtung vom potentiellen Startpunkt der SSU-mRNA (Pos. +1) eine TATA-Sequenz (Pos. -28 bis -31), die alle Voraussetzungen erfüllt, um als funktionell eingestuft zu werden. Darüber hinaus exsistiert in 3'-Richtung vom potentiellen mRNA-Startpunkt eine zweite TATA-Sequenz (Pos. +27 bis +24), deren Position im nicht kodierenden, aber transkribierten 5'-Bereich des SSU-Genes zwar ungewöhnlich ist (vgl. Abb. 39), die aber zur Konsensussequenz für TATA-Regionen nach Breathnach und Chambon (1981) zu etwa 64% homolog ist. Eine zusätzliche TATA-Region wurde in vergleichbarer Position auch im LHCP-Gen von Erbse gefunden (Cashmore, 1984). Möglicherweise geht bei den SSU- und LHCP-Genen, ähnlich wie bei einigen anderen eukaryotischen Genen (Schibler et al., 1983; Carlson und Botstein, 1982; Perlman et al., 1982; Benyajati et al., 1983), die Expression von dualen Promotoren aus.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der dualgenetische Ursprung komplexer Strukturen des Chloroplasten, wie etwa die in der vorliegenden Dissertation bearbeitete Thylakoidmembran mit ihren supramolekularen, an der Photosynthese beteiligten Multiproteinkomplexen, wirft zentrale Fragen hinsichtlich des Zusammenspiels der genetischen Kompartimente in Eukaryoten auf. Die Kooperation zwischen den genetischen Kompartimenten Kern/Cytoplasma und Plastide setzt die zeitlich und stöchiometrisch koordinierte Expression der beteiligten nukleären und plastidären Gene voraus. Während in den vergangenen Jahren zahlreiche Gene plastidär kodierter Polypeptide der Thylakoidmembran intensiv bearbeitet wurden, konnte nur ein nukleäres Gen dazu gefaßt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Voraussetzungen zur Isolation von cDNA-Sequenzen und der korrespondierenden Gene für nukleär kodierte Polypeptide der Thylakoidmembran geschaffen werden und darüber hinaus ein solches Gen, das für ein plastidäres Polypeptid kodiert, eingehend analysiert werden.

1. Es wurden diverse cDNA-Klonbanken von cytosolischer RNA aus Spinat (Spinacia oleracea) erstellt. Dabei wurden sowohl verschiedene Methoden der cDNA-Synthese und Klonierung verwendet, als auch qualitativ unterschiedliche Populationen an Poly(A)$^+$-RNA als Matrize zur cDNA-Synthese eingesetzt. Durch Fraktionierung der Poly(A)$^+$-RNA im Dichtegradienten auf Saccharosebasis wurde eine Anreicherung weniger abundanter mRNA-Spezies erreicht. Die Qualität der RNA-Fraktionen wurde durch zellfreie Translation im Kaninchen-Retikulocytenlysat überprüft.

2. Die erstellten cDNA-Klonbanken wurden durch Hybridselektion der mRNA, zellfreie Translation im Kaninchen-Retikulocytenlysat und die Translationsprodukte immunologisch mit monospezifischen Antiseren gesichtet. Auf diese Weise ließen sich aus ca. 2000 Einzelklonen fünf verschiedene Klontypen selektieren, die cDNA-Sequenzen für kernkodierte, plastidäre Polypeptide enthielten. Von diesen kodierten vier für Polypeptide der Thylakoidmembran, nämlich für Plastocyanin (PC), das mit dem Reaktionszentrum des Photosystems I assoziiert ist, für ein Chlorophyll a/b-bindendes Polypeptid (LHCP) des Antennenkomplexes des Photosystems II, für die Delta-Untereinheit (DEL) der ATP-Synthase und die 34kd-Untereinheit (34kd) des Wasserspaltungskomplexes des Photosystems II (Jansen, 1985). Die fünfte cDNA-Sequenz kodierte für die kleine-

re der beiden Untereinheiten (SSU) des Stromaenzyms Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase. Insgesamt konnten 20 cDNA-Klone für diese Polypeptide isoliert werden, die cDNA-Sequenzen mit Längen zwischen 220 und 880 bp enthielten.

3. Einige der cDNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung charakterisiert. Dabei ergab sich, daß die untersuchten cDNA-Fragmente für LHCP, PC, das 34kd-Polypeptid und vermutlich auch für die Delta-Untereinheit sowohl kodierende, als auch nicht kodierende, 3'-flankierende Sequenzen der jeweiligen mRNA-Spezies enthalten.

   a) Die aus dem kodierenden Bereich der cDNA für PC abgeleitete Aminosäuresequenz umfaßt mehr als 60% des reifen PC-Polypeptides und ist zur bekannten Aminosäuresequenz nach Scawen et al. (1975) zu 100% homolog.

   b) Für die abgeleitete Aminosäuresequenz des LHC-Polypeptides wurde die einzige bekannte Aminosäuresequenz eines LHC-Polypeptides von Pisum (Cashmore, 1984) zum Vergleich herangezogen. Aus dem Sequenzvergleich folgte, daß die cDNA für das LHC-Polypeptid von Spinat für 220 Aminosäuren, d.h. etwa 94% des LHC-Strukturpolypeptides kodiert. Darüber hinaus zeigte sich überraschenderweise, daß die Sequenzen der Polypeptide aus beiden Organismen stark konserviert sind (95% Homologie). Zudem sind die veränderten Aminosäuren als konservative Austausche zu klassifizieren. Erwartungsgemäß entsprechen sich auch die Hydropathieprofile der Polypeptide. Sie zeigen übereinstimmend drei hydrophobe Sequenzabschnitte, bei denen es sich möglicherweise um Transmembransegmente handelt.

   c) Die cDNA für das 34kd-Polypeptid des Wasserspaltungskomplexes enthält ein offenes Leseraster über 510 bp, die für 170 Aminosäuren kodieren. Das entspricht etwa 56% des 34kd-Strukturpolypeptides. Die Zusammensetzung der abgeleiteten Aminosäuresequenz dieses Polypeptides entspricht tendenziell der Aminosäurezusammensetzung für das 34kd-Polypeptid nach Kuwabara und Murata (1982); Sequenzinformation für dieses Polypeptid gibt es in der Literatur nicht.

   d) Die cDNA für die Delta-Untereinheit der ATP-Synthase ist mit 179 bp die kürzeste der untersuchten cDNAs. Da auch hier keine brauchbaren Vergleichssequenzen existieren , war eine exakte Analyse der cDNA-Sequenz nicht möglich. Vermutlich enthält die DEL-cDNA vornehmlich Sequenzen des nicht kodie-

renden 3'-Bereiches der mRNA für DEL, denn wie bei den cDNAs für die anderen Polypeptide wurde auch hier ein potentielles Polyadenylierungssignal in korrektem Abstand zur Polyadenylierungsstelle gefunden.

e) Die untersuchte cDNA für SSU kodiert im Gegensatz zu den übrigen isolierten SSU-cDNAs für das komplette Transitpolypeptid. Sie enthält außerdem nicht kodierende Sequenzen des 5'-Bereiches der korrespondierenden mRNA. SSU-Transitpolypeptide sind für eine Reihe von Pflanzenspezies bekannt. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt interessante, noch unverstandene Gemeinsamkeiten, die vermutlich im Zusammenhang zur Funktion dieser Sequenzabschnitte als Transitsequenzen stehen.

Die sequenzierten cDNA-Fragmente wurden benutzt, um (4) Transkriptgrößen zu bestimmen, (5) die Importfähigkeit der zellfrei synthetisierten Polypeptidvorstufen in isolierte Chloroplasten zu überprüfen sowie (6) Southernanalysen mit Kern-DNA vorzunehmen und (7) korrespondierende Gene aus der genomischen Lambda-Klonbank zu selektieren.

4. Die Längen der mRNA-Spezies für PC, SSU, DEL und LHCP wurden durch Hybridisierung ^{32}P-markierter cDNA-Fragmente gegen Poly(A)$^+$-RNA mit 850 (PC), 950 (SSU), 1050 (DEL) und 1150 b (LHCP) ermittelt.

5. Alle bekannten, kernkodierten Polypeptide der Thylakoidmembran sowie die SSU der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase werden als höhermolekulare Vorstufen im Cytoplasma synthetisiert. Die Vorstufen werden bei ihrer Passage durch die Chloroplastenmembran zu reifen Polypeptiden prozessiert. Der "in organello"-Import kernkodierter, plastidärer Polypeptide wurde mit zellfrei synthetisierten Polypeptidvorstufen für SSU, PC sowie LHCP und intakten, isolierten Chloroplasten aus Spinat durchgeführt. Es ließ sich zeigen, daß die im heterologen Weizenkeimextrakt synthetisierten, höhermolekularen Vorstufen alle notwendigen Signale für Import und Prozessierung enthalten. Die importierten, reifen Polypeptide nahmen im Chloroplasten ihre korrekten topologischen Positionen ein.

6. Durch Hybridisierung der cDNA-Fragmente für LHCP, PC und DEL gegen restringierte Kern-DNA von Spinat konnten je 1-2 gentragende DNA-Segmente sondiert

werden, die wohl ein oder zwei entsprechende nukleäre Gene repräsentieren. Die Hybridisierung der genomischen SSU-Fragmente gegen restringierte Kern-DNA ergab dagegen ein komplexes Hybridisierungsmuster, das, wie auch bei anderen Organismen, die Exsistenz mehrerer SSU-Gene, d.h. einer Genfamilie, anzeigt.

7. Die charakterisierten cDNA-Fragmente wurden auch zur Selektion entsprechender nukleärer Gene eingesetzt. Dazu wurde zunächst eine genomische Klonbank mit Sau3A partiell restringierter DNA aus isolierten Zellkernen von Spinat und dem Lambda-Vektor EMBL4 erstellt. Nach sorgfältiger Optimierung der Klonierungs- und Selektionsbedingungen konnten aus der genomischen Klonbank Gene für SSU, LHCP (3 Klone) und PC isoliert werden. Erste Restriktionsanalysen der LHCP-Fragmente lassen vermuten, daß die LHCP-Gene unterschiedliche Mitglieder einer Genfamilie darstellen.

Der isolierte, genomische Klon für die SSU wurde eingehend charakterisiert.

8. Der genomische Klon für SSU wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung studiert. Der sequenzierte Bereich umfaßt ca. 1400 bp, wobei sich der transkribierte Genbereich über etwa 1000 bp und die nicht transkribierte 3'-Region über etwa 100 bp erstreckt. Der für die Regulation und Initiation der Transkription wichtige, nicht transkribierte 5'-Bereich wurde über ca. 300 bp sequenziert.

   Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der SSU-cDNA und der genomischen DNA läßt vermuten, daß beide Klone verschiedene Gene der SSU-Genfamilie repräsentieren.

   Das untersuchte SSU-Gen von Spinat ist aus 3 Exons und 2 Introns aufgebaut, wobei das am weitesten im 5'-Bereich des Genes gelegene Exon 1 für das SSU-Transitpolypeptid und die beiden ersten Aminosäuren des SSU-Strukturpolypeptides kodiert. Der Rest der Sequenz für das Strukturpolypeptid ist auf die Exons 2 und 3 verteilt. Zwischen den Exons liegen Introns mit 110 bzw. 99 Nukleotiden; sie sind zueinander kaum homolog.

   Die aus der Nukleotidsequenz der Exons 2 und 3 abgeleitete Sequenz des SSU-Strukturpolypeptides ist in Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz des reifen SSU-Polypeptides von Spinat (Martin, 1979) 123 Aminosäuren lang. Die Ho-

mologie zwischen den beiden Polypeptiden beträgt jedoch nur 73%. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da die Homologie zwischen verschiedenen SSU-Strukturpolypeptiden derselben Pflanzenspezies bei Pisum und Nicotiana mehr als 90% beträgt. Allerdings beschränken sich die Aminosäureaustausche zwischen den SSU-Polypeptiden von Spinat weitgehend auf Sequenzbereiche, die zwischen den SSU-Polypeptiden verschiedener dikotyler und monokotyler Pflanzenspezies (Pisum, Nicotiana, Glycine, Lemna, Triticum) als nicht konserviert gelten.

Für die Sequenzen an den Exon/Intron- und Intron/Exon-Grenzen gilt die GT/AG-Regel (Breathnach und Chambon, 1981).

Die Hypothese von Gilbert et al. (1979), daß Exons funktionelle Domänen von Polypeptiden kodieren, ist bezüglich der SSU-Gene von Pisum, Glycine, Triticum und auch Spinacia zutreffend. Das Exon 1 kodiert für das Transitpolypeptid, und die konservierten Sequenzen des SSU-Strukturpolypeptides mit den Bindungsstellen für die große Untereinheit des Enzyms sind auf die Exons 2 und 3 verteilt und nicht durch Introns unterbrochen.

9. Die nicht transkribierte, flankierende 5'-Region des SSU-Genes enthält die typischen Sequenzelemente für die Expression in üblicher Position eukaryotischer Gene. Dazu gehören die TATA-Region (Position -28 bis -31), die bei diesem Gen für die lichtinduzierte Expression des Genes diskutiert wird (Morelli et al., 1985), zwei CAAT-Regionen (Position -78 bis -81 und -85 bis -88) sowie regulatorische "Enhancer"-Elemente. Die potentiellen "Enhancer"-Elemente des SSU-Genes von Spinat sind zu 50-70% den "Enhancer"-Sequenzen des IgC_{μ}-Genes der Maus homolog.

10. Die Kodonnutzung der nukleären Gene unterscheidet sich von der plastidärer Gene. Im Gegensatz zur Plastide werden im Kern/Cytoplasma-Kompartiment zu etwa 60% Kodons verwendet, die in der dritten, nicht konservierten Triplettposition auf G und C enden (ca. 30% in der Plastide). Für die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu), Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Asparagin (Asn) und Tyrosin (Tyr) scheint die Kodonnutzung kompartimentspezifisch zu sein, d.h. im Kern/Cytoplasma werden für diese Aminosäuren überwiegend andere Kodons benutzt als in der Plastide. Für einzelne Aminosäuren (z.B. Glutaminsäure) existieren auch Hinweise auf genspezifische Kodonnutzung.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Aaij C. und Borst P. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 269, 192-200

Åkerlund H.E., Jansson C. und Andersson B. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 631, 1-10

Alt J., Winter P., Sebald W., Moser J.G., Schedel R., Westhoff P. und Herrmann R.G. (1983)
Curr. Genet. 7, 129-138

Alt J. und Herrmann R.G. (1984)
Curr. Genet. 8, 551-557

Alt J., Morris J., Westhoff P. und Herrmann R.G. (1984)
Curr. Genet. 8, 597-606

Apel K. (1981)
Eur. J. Biochem 120, 89-93

Apel K. (1979)
Eur. J. Biochem. 97, 183-188

Apel K. und Kloppstech K. (1978)
Eur. J. Biochem. 85, 581-588

Arnon D.J. (1949)
Plant Physiol. 24, 1-15

Arntzen C.J. und Burke J.J. (1980)
In: Methods in Enzymology 69, 520-538

Aviv H. und Leder P. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412

Anderson J.M. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 416, 191-235

Baker C. und Ziff E. (1981)
J. Mol. Biol. 149, 189-221

Baltimore D. (1970)
Nature 226, 1209-1210

Banerji J., Rusconi S. und Schaffner W. (1981)
Cell 27, 299-308

Banerji J., Olson L. und Schaffner W. (1983)
Cell 33, 729-740

Banerjee A.K. (1980)
Microbiol. Rev. 44, 175-205

Baralle F.E. (1983)
Int. Rev. Cytol. 81, 71-106

Bartlett S.G., Grossman A.R. und Chua N.H. (1982)
In: Methods in Chloroplast Molecular Biology
Edelman M., Hallick R., Chua N.H. (eds)
Amsterdam New York Oxford. Elsevier/Biomedical Press, 1081-1091

Baur E. (1909)
Z. Vererbungsl. 1, 330-351

Bedbrook J.R. und Kolodner R. (1979)
Annu. Rev. Plant Physiol. 30, 593-620

Bedbrook J.R., Smith S.M. und Ellis R.J. (1980)
Nature 287, 692-697

Bell G.I., Pictet R.L., Rutter W.J., Cordell B., Tischer E. und
Goodman H. (1980)
Nature 284, 26-32

Bengis C. und Nelson N. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 2783-2788

Bengis C. und Nelson N. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 4564-4569

Bennett W.F., Gutierrez-Hartmann A. und Butow R.A. (1976)
In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria, 801-806
Bücher Th. et al. (eds); Elsevier Noth-Holland, Amsterdam, New York

Bennett J., Steinback K.E. und Arntzen C.J. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5253-5257

Benoist C., O'Hare K., Breathnach R. und Chambon P. (1980)
Nucl. Acids Res. 8, 127-142

Benoist C. und Chambon P. (1981)
Nature 290, 304-310

Benton W.D. und Davis R.W. (1977)
Science 196, 180-182

Benyajati C., Spoerel N., Haymerle H. und Ashburner M. (1983)
Cell 33, 125-133

Berk A. und Sharp P. (1977)
Cell 12, 721-732

Berry-Lowe, S.L., McKnight T.D., Shah D.M. und Meagher R.B. (1982)
J. Mol. and Appl. Gen. 1, 483-498

Birnboim H.C. und Doly J.D. (1979)
Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523

Bishop J.O., Morton J.G., Rosbash M. und Richardson M. (1974)
Nature 250, 199-204

Blair G.E. und Ellis R.J. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319, 223-234

Blattner F.R., Williams B.G., Blechl A.E., Deniston-Thompson K., Faber H.E., Furlong L.A., Grunwald D.J., Kiefer D.O., Moore D.D., Sheldon E.L. und Smithies O. (1977)
Science 196, 161 ff

Blattner F.R., Blechl A.E., Denniston-Thompson K., Faber H.E., Richards J.E., Slightom J.L., Tucker R.W. und Smithies O. (1978)
Science 202, 1279-1284

Blobel G. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1496-1500

Blobel G. und Dobberstein B. (1975a)
J. Cell Biol. 67, 835-851

Blobel G. und Dobberstein B. (1975b)
J. Cell Biol. 67, 852-862

Bohnert H.J., Driesel A.J., Herrmann R.G. (1976)
In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria.
Bücher T., Neupert W., Sebald W., Werner S. (eds)
North/Holland, Amsterdam New York, 629-636

Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L. Boyer H.W., Crossa J.H. und Falkow S. (1977)
Gene 2, 95-113

Borst P., Tabak H.F. und Grivell L.A. (1983)
In: Eukaryotic Genes: Their Strukture, Activity and Regulation, 71-84
Maclean N., Gregory S.P. und Flavell R.A. (eds); Butterworths

Borst P., Grivell L.A. und Groot G.S.P. (1984)
Trends Biochem. Sci. 9, 128-130

Breathnach R. und Chambon P. (1981)
Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383

Broglie R., Coruzzi G., Lamppa G., Keith B. und Chua N.H. (1983)
Bio/Technology 1, 55-61

Broglie R. et al. (1984)
Science 224, 838-843

Bünemann H., Westhoff P. und Herrmann R.G. (1982)
Nucl. Acids Res. 10, 7163-7180

Burke J.J., Steinback K.E. und Arntzen C.J. (1979)
Plant Physiol. 63, 237-243

Carlson M. und Botstein D. (1982)
Cell 28, 145-154

Carmichael G.G. und McMaster G.K. (1980)
In: Methods in Enzymology 65, 380-391

Cashmore A.R., Broadhurst M.K. und Gray R.E. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 655-659

Cashmore A.R. (1983)
In: Genetic Engineering of Plants, 29-38
Kosuge T., Meredith C.P. und Hollaender A. (eds), Plenum, New York

Cashmore A.R. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2960-2964

Chamberlain J.P. (1979)
Anal. Biochem. 98, 132-135

Chambon P., Benoist C., Breathnach R., Cochet M., Gannon F., Gerlinger P., Krust A., LeMeur M., LePennec J.P., Mandel J.L., O'Hare K. und Perrin F. (1979)
In: From Gene to Protein: Information Transfer in Normal and Abnormal Cells
Russell T.R., Brew K., Faber H. und Schultz J. (eds), 55-81. Acad. Press NY

Chin W., Kronenberg H., Dee P., Maloof F. und Habener J. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5329-5333

Choe J., Kolodrubetz D. und Grunstein M. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1484-1487

Chua N.H. und Schmidt G.W. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 6110-6114

Chun E.H.L., Vaughn M.H. und Rich A. (1963)
J. Mol. Biol. 7, 130-141

Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirscher M.W. und Laemmli U.K. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 1102-1106

Cochet M., Perrin F., Gannon F., Krust A. und Chambon (1979)
Nucl. Acids Res. 6, 2435-2452

Coen D.M., Bedbrook J.R., Bogorad L. und Rich A. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5487-5491

Correns C. (1909)
Z. Vererbungsl. 1, 291-329

Coruzzi G., Broglie R., Cashmore A.R. und Chua N.H. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 1399-1402

Coruzzi G., Broglie R., Edwards C. und Chua N.H. (1984)
EMBO J. 3, 1671-1679

Covey S.N. und Grierson D. (1976)
Eur. J. Biochem. 63, 599-606

Crick F.H.C. (1966)
J. Mol. Biol. 19, 548-555

Dagert M. und Ehrlich S.D. (1979)
Gene 6, 23-28

Darnell J.E., Jr. (1982)
Nature 297, 365-371

Davis B.D. und Tai P.C. (1980)
Nature 283, 433-438

Delepelaire P. und Chua N.H. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 111-115

De Villiers J. und Schaffner W. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 6251-6264

Dimock K. und Stoltzfus C.M. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 5591-5594

Driesel A.J. (1975)
Diplomarbeit, Universität Köln

Driesel A.J., Crouse E.J., Gordon K., Bohnert H.J., Herrmann R.G., Steinmetz A., Mubumbila M., Keller M., Burkard G. und Weil J.H. (1979)
Gene 6, 285-306

Dobberstein B., Blobel G. und Chua N.H. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1082-1085

Dobson M.J., Tuite M., Roberts N., Kingsman A., Kingsman S., Perkins R., Conroy S., Dunbar B. und Fothergill L.A. (1982)
Nucl. Acids Res. 10, 2625-2637

Dunsmuir P., Smith S.M. und Bedbrook J. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, 4177-4183

Edgell M.H., Weaver S., Haigwood N. und Hutchinson C.A. (1979)
In: Genetic Engineering, Vol 1
Setlow J.K. und Hollander A. (eds); Plenum Press, New York und London

Edmonds M., Vaughn M.H. und Nakazato H. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1336 ff

Efstratiadis A., Kafatos F.C., Maxam A.M. und Maniatis T. (1976)
Cell 7, 279-288

Efstratiadis A., Kafatos F.C. und Maniatis T. (1977)
Cell 10, 571-585

Efstratiadis A., Posakony J., Maniatis T., Lawn R., O'Connell C., Spritz R., DeRiel J., Forget B., Weissman S., Slightom J., Blechl A., Smithies O., Baralle F., Shoulders C. und Proodfoot N. (1980)
Cell 21, 653-668

Eisenstadt J. und Brawerman G. (1963)
Biochim. Biophys. Acta 76, 319-321

Ellis R.J. und Robinson C. (1984)
In: The Enzymology of the Post-Translational Modification of Proteins, Vol 2
Freedman R.B. und Hawkins H.C. (eds); Academic Press

Eneas-Filho J., Hartley M.R. und Mache R. (1981)
Mol. Gen. Genet. 184, 484-488

Englund P.T. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 5684-5687

Eperon I.C., Anderson S. und Nierlich D.P. (1980)
Nature 286, 460-467

Everett R.D., Baty D. und Chambon P. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, 2447-2464

Feiss M., Fisher R.A., Crayton M.A. und Enger C. (1977)
Virology 77, 281-293

Filipowicz W. (1978)
FEBS Lett. 96, 1-11

Filner B. und Klein A.O. (1968)
Pl. Physiol. 43, 1587-1596

Flavell R.B. (1982)
In: Nucleic Acids and Proteins in Plants II, 46-74
Parthier B. und Boulter D. (eds); Springer, Berlin Heidelberg New York

Flint S.J. (1981)
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 93, 47-79

Frayley R.T. et al. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4803-4807

Frischauf A., Lehrach H., Poustka A. und Murray N. (1983)
J. Mol. Biol. 170, 827-842

Fromm M. und Berg P. (1982)
J. Mol. Appl. Genet. 1, 457-481

Furuichi Y., LaFiandra A. und Shatkin A.J. (1977)
Nature 266, 235-239

Galau G.A., Klein W.H., Davies M.M., Wold B.J., Britten R.J. und Davidson E.H. (1976)
Cell 7, 487-505

Gallagher T.F. und Ellis R.J. (1982)
EMBO J. 1, 1493-1498

Gallwitz D., Perrin F. und Seidel R. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 6339-6350

Gasser S., Daum G. und Schatz G. (1982b)
J. Biol. Chem. 257, 13034-13041

Gasser S., Ohashi A., Daum G., Boehni P.C., Gibson J., Reid G.A., Yonetani T. und Schatz G. (1982a)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 267-271

Gay N.J. und Walker J.E. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 3919-3926

Gilbert W. (1979)
In: Eukaryotic Gene Regulation. Symp. on Mol. and Cell. Biol., Vol 14, 1-14
Axel R., Maniatis T. und Fox F. (eds); Acad. Press, New York

Gillies S.D., Morrison S.L., Oi V.T. und Tonegawa S. (1983)
Cell 33, 717-728

Gillies S.D., Folsom V. und Tonegawa S. (1984)
Nature 310, 594-597

Goldberg M, (1979)
Ph.D. thesis, Standford University, Standford, California

Graham D., Grieve A.M. und Smillie R.M. (1968)
Nature 218, 89-90

Grivell L.A. (1983)
Sci. Am. 248, 78-89

Gooding L.R., Roy H. und Jagendorf A.T. (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 159, 324-335

Grossman A., Bartlett S. und Chua N.H. (1980)
Nature 285, 625-628

Grossman A., Bartlett S.G., Schmidt G.W., Mullet J.E. und Chua N.H. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 1558-1563

Grosschedl R. und Birnstiel M.L. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7102-7106

Grunstein M. und Hogness D. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961-3965

Gruss P., Dhar R. und Khoury G. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 943-947

Hagemann R. (1964)
Plasmatische Vererbung. Fischer, Jena

Hardies S.C. und Well R.D. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3117-3121

Harms E., Rohde W., Bosch F. und Scholtissek C. (1978)
Virology 86, 413-422

Harwood R. (1980)
In: The Enzymology of Post-Translational Modification of Proteins, Vol 1
Freedman R.B. und Hawkins H.C. (eds); Academic Press, London

Heinemeyer W., Alt. und Herrmann R.G. (1984)
Curr. Genet. 8, 543-549

Henderson R. und Unwin P.N.T. (1975)
Nature 275, 28-32

Hennig B. und Neupert W. (1981)
Eur. J. Biochem. 121, 203-212

Hennighausen L., Sippel A., Hobbs A. und Rosen J. (1982)
Nucl. Acids Res. 10, 3733-3744

Henry L.E.A. und Moeller (1981)
Carlsberg Res. Commun. 46, 227-242

Herrmann R.G. und Possingham J.V. (1980)
In: Results and problems in cell differentiation, vol X.
Reinert J. (ed); Spinger, Berlin Heidelberg New York, 45-96

Herrmann R.G., Westhoff P., Alt J., Winter P., Tittgen J., Bisanz C., Sears B.B.,
Nelson N., Hurt E., Hauska G., Viebrook A. und Sebald W. (1983)
In: Strukture and Function of Plant Genomes, 143-153
Ciferri O. und Dure L. (eds)
Plenum Publishing Corporation

Herrmann R.G., Westhoff P., Alt J., Tittgen J. und Nelson N. (1985)
In: Molekular Form and Funktion of the Plant Genome, 233-256
v. Vloten-Doting L., Hall T. und Groot G. (eds)
Plenum Publishing Corporation

Heyneker H.L., Shine J. Goodman H., Boyer H.W., Rosenberg J., Dickerson B.,
Narang S.A., Itakura K., Lin S. und Riggs A.D. (1976)
Nature 263, 749-752

Highfield P.E. und Ellis R.J. (1978)
Nature 271, 420-424

Hohn B. und Hohn Th. (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2372-2376

Hohn Th. und Katsura I. (1977)
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 78, 69-110

Hohn B. und Murray K. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3259-3263

Hohn B. (1979)
In: Methods in Enzymology 68, 299-309

Huisman J.G., Moorman A.F.M. und Verkley (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 1121-1131

Hunter A.R., Hunt T., Knowland J. und Zimmer D. (1976)
Nature 260, 759-764

Hurt E. und Hauska G. (1981)
Eur. J. Biochem. 117, 591-599

Huynh Th. V., Young R.A. und Davis R.W. (1984)
In: DNA Cloning: A Practical Approach
Glover D. (ed) IRL Press, Oxford

Jackson D.A., Symons R.H. und Berg P. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2904-2909

Jacobsen H., Klenow H. und Ovargaard-Hansen K. (1974)
Eur. J. Biochem. 45, 623 ff

Jagodzinski L., Sargent T., Yang M., Glackin C. und Bonner J. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3521-3525

Jansen Th. (1985)
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

Jenkins G. I., Hartley M.R. und Bennett J. (1983)
Phil. Trans. R. Soc. Lond. 303, 419-431

Jung A., Sippel A.E., Grez M., Schutz G. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5759-5763

Kaechler M., Coward J. und Rottman F. (1979)
Nucl. Acids. Res. 6, 1161-1175

Kakidani H., Furutani Y., Takahaski H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T.,
Asai M., Inayama S., Nakanishi S. und Numa S. (1982)
Nature 298, 245-249

Kamalay J.C. und Goldberg R.B. (1980)
Cell 19, 935-946

Kaput J., Goltz S. und Blobel G. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 15054-15058

Karin M. und Richards R.I. (1982)
Nucl. Acids Res. 10, 3165-3173

Karn J., Brenner S., Barnett L. und Cesareni G. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5172-5176

Kawashima N. und Wildman S.G. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 262, 42-49

Kellems R.E., Allison V.F. und Butow R.A. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 3297-3303

Kelly R.G., Cozzarelli N., Deutscher M.R., Lehman I.R. und Kornberg A. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 39 ff

Kessler S.W. (1975)
J. Immunol. 115, 1617-1624

Kirk J.T.O. (1963)
Biochim. Biophys. Acta 76, 417-424

Kirk J.T.O. und Tilney-Bassett (1978)
The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance.
Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York

Kolodner R. und Tewari K.K. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 402, 372-390

Kozak M. (1980)
Cell 22, 7-8

Kozak M. (1981a)
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 93, 81-123

Kozak M. (1981b)
Nucl. Acids Res. 9, 5233-5252

Kozak M. (1983)
Microbiol. Rev. 47, 1-45

Kühlbrandt W. (1984)
Nature 307, 478-480

Kutzelnigg M. und Stubbe W. (1974)
Sub-Cell. Biochem. 3, 73-89

Kuwabara T. und Murata N. (1982)
Plant and Cell Physiol. 23, 533-539

Kyte J. und Doolittle R.F. (1982)
J. Mol. Biol. 157, 105-132

Laemmli U.K. (1970)
Nature 227, 680-684

Laimins L.A., Khoury G., Gorman C., Howard B. und Gruss P. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6453-6457

Land H., Grez M., Hauser H., Lindenmaier W. und Schütz G. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 2251-2266

Lang J.C., Spandidos D.A. und Wilkies N.M. (1984)
EMBO J. 3, 389-395

Laulhere J.P. und Dorne A.M. (1977)
Plant Sci. Lett. 8, 251-256

Lawn R.M., Fritsch E.F., Parker R.C., Blake G. und Maniatis T. (1978)
Cell 15, 1157-1174

Lewin B. (1980a)
Cell 22, 324-326

Lewin B. (1980b)
Cell 22, 645-646

Lewin B. (1980c)
In: Gene Expression, Vol 2; Wiley, New York

Lindahl G., Sironi G., Bialy H. und Calender R. (1970)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 587-594

Ljungberg U., Åkerlund H.E., Larsson Ch. und Andersson B.
Biochim. Biophys. Acta, in press

Lis J.T. (1980)
In: Methods in Enzymology 65

Lobban P.E. und Kaiser A.D. (1973)
J. Mol. Biol. 78, 453-471

Luciw P.A., Bishop J.M., Varus H.E. und Capecchi M. R. (1983)
Cell 33, 705-716

Lusky M., Berg L., Weiher H. und Botchan M. (1983)
Molec. Cell. Biol. 3, 1108-1122

Lyttleton J.W. (1962)
Exp. Cell Res. 26, 312-317

Machold O. und Aurich O. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 281, 103-112

Machold O., Simpson D.J. und Møller B.L. (1979)
Carlsberg Res. Commun. 44, 235-254

Mandel M. und Higa A. (1970)
J. Mol. Biol. 53, 159-162

Maniatis T., Jeffrey A. und Kleid D.G. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1184 ff

Maniatis T., Kim G.R., Efstratiadis A. und Kafatos F.C. (1976)
Cell 8, 162-182

Maniatis T., Hardison R.C., Lacy E., Lauer J., O'Connell C.,
Quon D., Sim G.K. und Efstratiadis (1978)
Cell 15, 687-701

Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J. (1982)
In: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 264-267
Cold Spring Harbor Laboratory

Markert C.L. und Møller F. (1959)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45, 753-763

Martin P.G. (1979)
Aust. J. Plant Physiol. 6, 401-408

Mathis D.J. und Chambon P. (1981)
Nature 290, 310-315

Mazur B.J. und Chui C.F. (1985)
Nucl. Acids Res. 13, 2373-2386

Maxam A.M. und Gilbert W. (1980)
In: Methods in Enzymology 65, 499-560

McDonnell M.W., Simon M.N. und Studier F.W. (1977)
J. Mol. Biol. 110, 119 ff

McIntosh L., Poulsen C. und Bogorad L. (1980)
Nature 288, 556-560

McKeown M. und Firtel R.A. (1981a)
Cell 24, 799-807

McKeown M. und Firtel R.A. (1981b)
J. Mol. Biol. 151, 593-606

McMaster G.K. und Carmichael G.G. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 11, 4835-4838

Melton D.A., Krieg P.A., Rebagliati M.R., Maniatis T., Zinn K.
und Green M.R. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 7035-7056

Mercola M., Wang X.F., Olsen J. und Calame K. (1983)
Science 221, 663-665

Meyer D.I. (1982)
Trend. Biochem. Sci. 7, 320-321

Michaelis P. (1955)
Züchter 25, 209-221

Michelson A. und Orkin S.H. (1980)
Cell 22, 371-377

Montgomery D., Leung D., Smith M., Shalit P., Faye G. und Hall B. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 541-545

Morelli G., Nagy F., Fraley R.T., Rogers S.G. und Chua N.H. (1985)
Nature 315, 200-204

Morris J. und Herrmann R.G. (1984)
Nucl. Acids Res. 12, 2837-2880

Mount S.M. (1982)
Nucl. Acids Res. 10, 459-472

Moyer S.A. (1981)
Virology 112, 157-168

Muller K.D., Salnikow J. und Vater J. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 742, 78-83

Mullet J.E. und Arntzen C.J. (1981)
Biochim. Biophys. Acta 635, 236-248

Mullet J.E., Grossman und Chua N.H. (1982)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46, 979-984

Mullet J.E. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 9941-9948

Nathans D. und Smith H.O. (1975)
Annu. Rev. Biochem. 44, 273-293

Nechushtai R., Nelson N., Mattoo A.K. und Edelmann M. (1981)
FEBS Lett. 125, 115-119

Nelson T. und Brutlag D. (1979)
In: Methods in Enzymology 68, 41-50

Nevins J.R. (1979)
J. Mol. Biol. 130, 493-506

Nevins J.R. (1983)
Annu. Rev. Biochem. 52, 441-466

Nielson J., Hansen F.G., Hoppe J., Friedl P. und von Meyenburg K. (1981)
Mol. Gen. Genet. 184, 33-39

Nierzwicki-Bauer S., Curtis S.E. und Haselkorn R. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5961-5965

Nishino N. und Powers J.C. (1978)
Biochemistry 17, 2846-2850

Noll H. (1967)
Nature 215, 360 ff

Norrander J., Kempe T. und Messing J. (1983)
Gene 26, 101-106

Palmiter R.D. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 2095 ff

Pavlakis G.N., Lockard R.E., Vamvakopoulas N., Rieser L.,
Raj Bhandary U.L. und Vournakis J.N. (1980)
Cell 19, 91-102

Perler F., Efstratiadis A., Lomedico P., Gilbert W., Kolodner R. und Dodgson J. (1980)
Cell 20, 555-566

Perlman D., Halvorson H.O. und Cannon L.E. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 781-785

Picard D. und Schaffner W. (1984)
Nature 307, 80-82

Pick U. und Racker E. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 2793-2799

Piper P.W. (1979)
J. Mol. Biol. 131, 399-407

Poole S., Firtel R.A., Lamar E. und Rowekamp W. (1981)
J. Mol. Biol. 153, 273-289

Preston C.M. und McGeoch D.J. (1981)
J. Virol. 38, 593-605

Pribnow D. (1975a)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 784-789

Pribnow D. (1975b)
J. Mol. Biol. 99, 419-443

Pribnow D. (1979)
In: Biological Regulation and Development, Vol 1, 219-277
Goldberger R. (ed); Plenum, New York

Proudfoot N.J. und Brownlee G.G. (1976)
Nature 263, 211-214

Ramshaw J.A.M., Scawen M.D., Bailey C.J. und Boulter D. (1974a)
Biochem. J. 139, 583-592

Ramshaw J.A.M., Scawen M.D. und Boulter D. (1974b)
Biochem. J. 141, 835-843

Redman C.M. und Sabatini D.D. (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 608-615

Reid G.A. und Schatz G. (1982a)
J. Biol. Chem. 257, 13062-13067

Reid G.A. und Schatz G. (1982b)
J. Biol. Chem. 257, 13056-13061

Renner O. (1934)
Ber. Verh. Sächs. Akad. Wiss. Lepzig Math. Phys. Kl. 86, 241-266

Rhoades M.M. (1946)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 202-207

Rhoads R.E. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 8088 ff

Rich A. (1982)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 1-12

Richardson C.C. (1971)
Nucl. Acids Res. 2, 815 ff

Ris H. und Plaut W. (1962)
J. Cell Biol. 13, 383-391

Röbbelen G. (1966)
Heynh. Z. Pflanzenphys. 55, 387-403

Roman R., Brooker J.D., Seal S.N. und Marcus A. (1976)
Nature 260, 359 ff

Rosenberg M. und Court D. (1979)
Annu. Rev. Genet. 13, 319-353

Rother Ch. (1985)
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

Rougeon F., Kourilsky P. und Mach B. (1975)
Nucl. Acids Res. 2, 2365-2378

Rougeon F. und Mach B. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3418-3422

Rougeon F. und Mach B. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 2209-2217

Röwekamp W. und Firtel R.A. (1980)
Dev. Biol. 79, 409 ff

Roy H., Terenna B. und Cheong L.C. (1977)
Plant Physiol. 60, 532-537

Roychoudhury R., Jay E. und Wu R. (1976)
Nucl. Acids Res. 3, 101-116

Rüther U., Koenen M., Otto K. und Müller-Hill B. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 4087-4098

Ryffel G.U., Wyler T., Muellener D. und Weber R. (1980)
Cell 19, 53-61

Ryrie I.J., Anderson J.M. und Goodchild D.J. (1980)
Eur. J. Biochem. 107, 345-354

Sager R. und Ishida M.R. (1963)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 725-730

Saraste M., Gay N.J., Eberle A., Runswick M.J. und Walker J.E. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 5287-5296

Sargent T.D., Wu J.R., Sala-Trepat J.M., Wallace R.B., Reyes A.A. und Bonner J. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3256-3260

Sasaki Y., Ishiye M., Sakihama T. und Kamikubo T. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 2315-2320

Scalenghe F., Buscaglia M., Steinheil C. und Crippa M. (1978)
Chromosoma 66, 299 ff

Scawen M.D., Ramshaw J.A.M. und Boulter D. (1974)
Eur. J. Biochem. 44, 299-303

Scawen M.D. und Boulter D. (1974)
Biochem. J. 143, 257-264

Scawen M.D., Ramshaw J.A.M. und Boulter D. (1975)
Biochem. J. 147, 343-349

Schatz G. und Mason T.L. (1974)
Annu. Rev. Biochem. 43, 51-87

Schatz G. und Butow R.A. (1983)
Cell 32, 316-318

Schibler U., Hagenbuchle O., Wellauer P.K. und Pittet A.C. (1983)
Cell 33, 501-508

Schinozaki K. und Sugiura M. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, 6957-6964

Schleyer M., Schmidt B. und Neupert W. (1982)
Eur. J. Biochem. 125, 109-116

Schmidt G.W., Devilliers-Thiery A., Desruisseaux H., Blobel G. und Chua N.H. (1979
J. Cell Biol. 83, 615-622

Schmidt G.W., Bartlett S., Grossman A.R., Cashmore A.R. und Chua N.H. (1980)
In: Genome organization and expression in plants, 337-351
Leaver C.J. (ed); Plenum, New York London

Schötz F. (1958)
Planta 51, 173-185

Seeberg P.H., Shine J., Markal J.A., Baxter J.D. und Goodman H.M. (1977)
Nature 270, 486-494

Setzer D.R., McGrogan M., Nunberg J. und Schimke R.T. (1980)
Cell 22, 361-370

Shah D.M., Hightower R.C. und Meagher R.B. (1983)
J. Mol. Appl. Genet. 2, 111-126

Sharp P.A. (1981)
Cell 23, 643-646

Shatkin A.J. (1976)
Cell 9, 645-653

Shenk T. (1981)
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 93, 25-46

Shine J. und Dalgarno L. (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342-1346

Siebenlist U., Simpson R.B. und Gilbert W. (1980)
Cell 20, 269-281

Siegelman H.W. und Hind G. (1978)
Photosynthetic carbon assimilation. Plenum Press, New York
Siegelman H.W., Hind G. (eds)

Simpson D.J. (1979)
Carlsberg Res. Commun. 44, 305-336

Sinsheimer R.L. (1977)
Annu. Rev. Biochem. 46, 415-438

Smith H.O. und Birnstiel M.L. (1976)
Nucl. Acids Res. 3, 2387-2398

Smith A.E., Kamen R., Mangel W., Shure H. und Wheeler T. (1976)
Cell 9, 481-487

Sonenberg N., Trachsel H., Hecht S. und Shatkin A.J. (1980)
Nature 285, 331-333

Southern E.M. (1975)
J.Mol. Biol. 98, 503-517

Spencer D. und Wildman S.G. (1964)
Biochemistry 3, 954-959

Spencer D.F., Bonen L. und Gray M.W. (1981)
Biochemistry 20, 4022-4029

Stafford D. und Bieber D. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 378, 18-21

Sternberg N., Tiemeier D. und Enquist L. (1977)
Gene 1, 255-280

Stiekema W.J., Wimpee C.F. und Tobin E.M. (1983)
Nucl. Acids Res. 11, 8051-8061

Struhl K., Cameron J.R. und Davis R.W. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1471-1475

Stubbe W. (1959)
Z. Vererbungsl. 90, 288-298

Sugino A., Goodman H.M., Heynecker H.L., Shine J., Boyer H.W. und Cozzarelli N.R. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 3987 ff

Sutcliffe J.G. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3737-3741

Temin H. und Mizutani S. (1970)
Nature 226, 1211-1213

Tewari K.K. (1979)
In: Nucleic acids in plants, vol I.; Hall T.C., Davis J.W. (eds)
CRC Press, Boca Raton, 41-108

Thomas P.S. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205

Thomas P.S. (1983)
In: Methods in Enzymology 100, 255-266

Thornber J.P. und Highkin H.R. (1974)
Eur. J. Biochem. 41, 109-116

Tilney-Bassett R.A.E. (1970)
Heredity 25, 89-103

Tittgen J. (1981)
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf

Tobin E.M. und Suttie J.L. (1980)
Pl. Physiol. 65, 641-647

Tosi M., Young R.A., Hagenbuchle O. und Schibler U. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 2313-2323

Twigg A.J. und Sherratt D. (1980)
Nature 283, 1211-1213

Tyndall C., LaMantia G., Thacker C., Favaloro und Kamen R. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 6231-6250

Tzagaloff A., Macino G. und Sebald W. (1979)
Annu. Rev. Biochem. 48, 419-441

Ullrich A., Shine J., Chrigwin J., Tischer E., Rutter W.J. und Goodman H. (1977)
Science 196, 1313-1319

Van Der Ploeg L.H.T., Groffen J. und Flavell R.A. (1980)
Nucl. Acids Res. 8, 4563-4574

Verma I.M. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 473, 1 ff

Viebrook A., Perz A. und Sebald W. (1982)
EMBO J. 1, 565-571

Villa-Komaroff L., Efstratiadis A., Broome S., Lomedico P., Tizard R., Naker S.P., Chick W.L. und Gilbert W. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3727-3731

von Wettstein D. (1981)
Chloroplast and nucleus: Concerted interplay between genomes of different cell organelles. The Emil Heitz lecture., 250-272
Schweiger G. (ed) Int. Cell Biol. 1980-1981.
Springer, Berlin Heidelberg New York

von Wettstein D., Møller B.L., Høyer-Hansen G. und Simpson D. (1982)
Mutants in the analysis of the photosynthetic membrane polypeptides, 245-257
Schiff J.A., Stainier R.Y. (eds) Origin of chloroplasts.
Elsevier/North-Holland Biomed. Press, Amsterdam New York

Wahl G.M., Stern M. und Stark G.R. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3683-3687

Walker M.D., Edlund T., Boulet A.M. und Rutten W.J. (1983)
Nature 306, 557-561

Wasylyk B., Wasylyk C., Matthes H., Wintzerith M. und Chambon P. (1983)
EMBO J. 2, 1605-1611

Weber K. und Osborn M. (1969)
J.Biol. Chem. 244, 4406-4412

Weber F. und Schaffner W. (1985)
Nature 315, 75-77

Weiher H., König M. und Gruss P. (1983)
Science 219, 626-631

Weiss B., Jacquemin-Sablon A., Live T.R., Fareed G.C. und Richardson C.C. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 4543 ff

Wensink P.C., Finnegan D.J., Donelson J.E. und Hogness D.S. (1974)
Cell 3, 315-325

Westhoff P., Nelson N., Bünemann H. und Herrmann R.G. (1981)
Curr. Genet. 4, 109-120

Westhoff P. und Zetsche K. (1981)
Eur. J. Biochem. 116, 261-267

Westhoff P., Alt J. und Herrmann R.G. (1983)
EMBO J. 2, 2229-2237

Westhoff P., Jansson Ch., Klein-Hitpaß L., Berzborn R., Larsson Ch., und Bartlett S. (1985)
Pl. Mol. Biol. 4, 137-146

Westhoff P. (1985)
Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf

Wettstein von D. (1967)
In: Harvesting the sun. San Pietro A., Greer A., Army T.J. (eds)
Academic Press, London New York 153-190

Wheeler A.M. und Hartley M.R. (1975)
Nature 257, 66-67

Wickner W. (1979)
Annu. Rev. Biochem. 48, 23-45

Williams J.G., Lloyd M.M. und Devine J. (1979)
Cell 17, 903-913

Williams J.G. und Lloyd M.M. (1979)
J. Mol. Biol. 129, 19-35

Willmitzer L. und Wagner K.G. (1981)
Exp. Cell Res. 135, 69-77

Wollgiehn R. und Parthier B. (1980)
In: Results and problems in cell differentiation, vol X.
Reinert J. (ed); Springer, Berlin Heidelberg New York, 97-145

Wood K.O. und Lee J.C. (1976)
Nucl. Acids Res. 3, 1961-1971

Yamamoto K.R., Alberts B.M., Benzinger R., Lawhorne L. und Treiber G. (1970)
Virology 40. 734 ff

Yamamoto Y., Doi M., Tamura N. und Nishimura M. (1981)
FEBS Lett. 133, 265-268

Yamamoto Y., Shimada S. und Nishimura M. (1983)
FEBS Lett. 151, 49-53

Young R.A. Und Davis R.W. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198

Zimmerman R., Paluch U. und Neupert W. (1979)
FEBS Lett. 108, 141-151

Zimmerman R., Henning B. und Neupert W. (1981)
Eur. J. Biochem. 116, 455-460

Zissler J., Singer E. und Schaefer F. (1971)
In: The bacteriophage Lambda, 455-476
Hershey A.D. (ed); Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, New York

Zurawski G., Perrot B., Bottomley W. und Whitfeld P.R. (1981)
Nucl. Acids Res. 9, 3251-3270

VII. DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand am Botanischen Institut der Universität Düsseldorf unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. R.G. Herrmann. Ich danke ihm für die Themenstellung, sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und zahlreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Hollenberg möchte ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferates danken.

Frau Dr. A.Viebrook (GBF/Braunschweig) und Frau Dr. S.Schwarz-Sommer vom MPI/Köln gilt mein besonderer Dank für die Einführung in die cDNA-Synthese.

Herrn Dr. P.Westhoff möchte ich an dieser Stelle für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Mein Dank gilt auch dem technischen Personal, besonders Frau Maria Smykalla sowie Frau Barbara Schiller und Frau Monika Streubel, die mir jederzeit mit Rat und Tat beiseite standen.

VIII. LEBENSLAUF

29.01.1952	als Sohn des Kaufmanns Helmut Tittgen und seiner Ehefrau Maria geb. Hobrücker in Düsseldorf geboren
1958-1963	Besuch der städtischen Volksschule in Düsseldorf
1963-1972	Besuch des städtischen Leibniz-Gymnasiums in Düsseldorf
15.05.1972	Abitur
1972-1974	Ableistung des Bundeswehrdienstes als Soldat auf Zeit
WS 1974/75	Beginn des Biologiestudiums an der Universität Düsseldorf
14.04.1977	Diplom-Vorprüfung in Biologie
Oktober 1979	mündliche Diplom-Hauptprüfung in Biologie
1979-1981	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann mit dem Thema: Identifizierung plastidärer tRNA-Arten und physikalische Kartierung ihrer Gene auf der Restriktionsendonukleasen-karte von Oenothera sp.
28.08.1981	Verleihung des akademischen Grades Diplom-Biologe
Oktober 1981 bis April 1985	Erarbeitung der experimentellen Daten zur vorliegenden Dissertation am Botanischen Institut IV der Universität Düsseldorf unter Prof. Dr. R.G. Herrmann

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606